

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**DESARROLLO ASEXUAL EN *ASPERGILLUS*  
*NIDULANS* : REGULACIÓN MOLECULAR Y  
CELULAR DE LA ACTIVIDAD DEL BZIP FIB**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Erika Herrero García**

**Bajo la dirección de los doctores**

**Eduardo A. Espeso Fernández  
Unai O. Ugalde Martínez**

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DPTO. DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



# **Desarrollo asexual en *Aspergillus nidulans*: Regulación molecular y celular de la actividad del bZIP FlbB**



Memoria presentada para optar al grado de Doctora por

**ERIKA HERRERO GARCÍA**  
**2012**

Directores de tesis:

Eduardo A. Espeso Fernández  
Científico Titular  
Centro de Investigaciones Biológicas  
CSIC

Tutor:

Álvaro Martínez del Pozo  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid

Unai O. Ugalde Martínez  
Profesor titular  
Facultad de Ciencias Químicas  
UPV/EHU





Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC bajo la dirección del Dr. **Eduardo A. Espeso Fernández**, Científico Titular del CSIC y el Dr. **Unai O. Ugalde Martínez**, Profesor Titular de la UPV/EHU.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección General de Investigación a través de los proyectos BFU2006-04185 y BFU2009-08701 y por una beca del Programa de Formación de Personal Investigador del Gobierno Vasco a la doctoranda Erika Herrero García.





*A mis aïtas,*



## ABREVIATURAS

3'UTR:	3' untranslated región o región 3' no transcrita
5'UTR:	5' untranslated región o región 5' no transcrita
Af:	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AF:	Aflatoxina
bZip:	Dominio de cremallera de leucina (Basic Zipper)
CDP:	<i>Central Developmental Pathway</i> o ruta central del desarrollo
CDS:	Secuencia codificante
CR:	Proteína roja fluorescente <i>CherryRed</i>
DAPI:	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilen diamino tetra-acético
EMSA:	Ensayo de Movilidad Electroforética (Retardo en Gel)
Fig.:	Figura
Flb:	Fluffy low bristle expression
FOA:	Ácido 5-fluororótico
FT:	Factor transcripcional
GFP:	Proteína fluorescente verde de la medusa <i>Aquore victoria</i>
GST:	Glutación-S-transferasa
HA:	Residuos 98-106 de la hemaglutinina del virus de la gripe humana
HEPES:	Ácido 4-[2-hidroxietil]-1-piperazinetanosulfónico
Hxq:	Hexoquinasa
IPTG:	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kDa:	Kilodalton (=1000Da)
min:	Minutos
MCA:	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
MES:	Ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico
MFA:	Medio fermentación de <i>Aspergillus</i>
MMA:	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
MMR:	Medio mínimo de regeneración
MMR-TOP:	Medio mínimo de regeneración-TOP
MOPS:	Ácido 3-[N-Morfolino]-propanosulfónico
mRFP:	Proteína monomérica fluorescente roja del coral <i>Discosoma striata</i>
mRNA:	Ácido Ribonucleico mensajero
ORF:	Open Reading Frame (Fase de lectura)
PABA:	Ácido p-aminobenzoico
PAGE:	Polyacrylamide gel electrophoresis
pb:	Pares de bases
PEG:	Polietilenglicol
PCR:	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PSA:	Persulfato amónico
rpm:	Revoluciones por minuto

rRNA:	RNA ribosomal
RNA:	Ácido Ribonucléico
RNAse:	Ribonucleasa
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
ST:	Esterigmatocistina
TCA:	Ácido tricloroacético
TEMED:	N, N, N, N-tetrametilendiamina
Tris:	Tris (hidroximetil)-aminometano
UDA:	<i>Upstream Developmental Activators</i> o activadores de la regulación temprana
UV:	Ultravioleta
VOC:	<i>Volatile Organic Compounds</i> o compuestos orgánicos volátiles
WMM:	Watch minimal medium
YFP:	Proteína amarilla fluorescente

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC.

## **ÍNDICE**



## INTRODUCCIÓN

---

<b>1.- Información general sobre <i>Aspergillus nidulans</i></b>	3
<b>2.- Programación genética del desarrollo</b>	8
2.1 Descripción física	8
2.2 Descripción genética	9
<b>3.- El Complejo Apical está formado por FlbB y FlbE</b>	14
<b>4.- Identificación de <i>flbB</i> y <i>flbE</i> y sus mutantes clásicos</b>	16
<b>5.- El factor FlbB: estudios bioinformáticos y funcionales</b>	18
<b>6.- El factor VeA, la luz y su rol en el desarrollo de los hongos</b>	24
<b>7.- Señales que actúan como morfógenos fúngicos</b>	27
7.1 El factor de FluG	28
7.2 Oxilipinas	29

## OBJETIVOS

---

<b>Objetivos</b>	33
------------------	----

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

<b>1.- Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados</b>	37
1.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	37
1.2 Oligonucleótidos	40
1.3 Plásmidos	42
1.3.1 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas <i>in vitro</i> y en <i>E. coli</i>	42
1.3.2 Plásmidos utilizados en <i>Aspergillus nidulans</i>	46
<b>2.- Condiciones y medios de cultivo para <i>Aspergillus nidulans</i></b>	49
2.1 Medio mínimo de <i>Aspergillus</i> (MMA)	49



2.2 Medio completo de <i>Aspergillus</i> (MCA) .....	49
2.3 Medio mínimo de regeneración base (MMR) y de cobertura (MMR-TOP) .....	50
2.4 Medio de fermentación (MFA) .....	50
2.5 Soluciones y suplementos para medios de <i>Aspergillus</i> .....	51
<b>3.-Transformación de <i>Aspergillus nidulans</i></b> .....	<b>53</b>
<b>4.- Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos</b> .....	<b>54</b>
4.1 Construcción de mutantes nulos y etiquetados .....	54
4.2 Extracción de DNA genómico de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	57
4.3 Extracción de RNA total de <i>A. nidulans</i> .....	58
4.4 Southern-blot .....	58
4.5 Northern-blot .....	59
4.6 Mutagénesis dirigida de FlbB .....	60
<b>5.- Técnicas de biología molecular para <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>61</b>
5.1 Condiciones y medio de cultivo para <i>E. coli</i> .....	61
5.2. Transformación de <i>E. coli</i> .....	61
5.3. Extracción de DNA plasmídico .....	61
<b>6.- Aislamiento y manipulación de proteínas de <i>A. nidulans</i></b> .....	<b>62</b>
6.1 Extracción de proteína total .....	62
6.2 Western-blot .....	63
<b>7.- Pull-down</b> .....	<b>65</b>
<b>8.- Fraccionamiento subcelular</b> .....	<b>65</b>

<b>9.- Microscopía de fluorescencia .....</b>	<b>66</b>
<b>10.- Herramientas bioinformáticas .....</b>	<b>67</b>
<b>11.- Extracción de toxinas y recuento de cleistotecios y conidias .....</b>	<b>68</b>
11.1 Extracción de toxinas .....	68
11.2 Recuento de cleistotecios .....	69
11.3 Recuento de conidias .....	69
<b>12.- Monitorización de los niveles de germinación, crecimiento y conidiación en los estudios sobre las oxilipinas .....</b>	<b>69</b>

## RESULTADOS

---

<b>1.- Relación molecular entre FlbB y FlbE .....</b>	<b>73</b>
1.1 Análisis bioinformáticos .....	73
1.2 Abordaje experimental .....	77
1.2.1 Optimización del ensayo de interacción <i>in vitro</i> entre FlbB y FlbE .....	77
1.2.2 Influencia de la región A de FlbB, posible región de interacción con FlbE, en la interacción <i>in vitro</i> .....	82
1.2.3 Deleción sistemática de las regiones conservadas en FlbB y su efecto sobre la interacción con FlbE .....	83
1.2.4 Demostración de la existencia de interacciones intermoleculares FlbB-FlbB .	88
1.2.5 Efecto del dominio de dimerización en las interacciones intermoleculares FlbB-FlbB .....	91
1.2.6 La interacción de GST-FlbB con FlbE-GFP no está mediada por el FlbB endógeno .....	94

<b>2.- Regulación transcripcional de FlbB: Evidencia de la autorregulación de la transcripción de <i>flbB</i></b> .....	96
2.1 Truncamientos en el extremo C-terminal reducen los niveles de FlbB .....	96
2.2 Múltiples copias de FlbB permiten visualizar a la proteína mutante FlbB 1-361 ...	100
2.3 Mutagénesis dirigida de la metionina iniciadora de FlbB .....	102
<b>3.- Análisis fenotípico de formas mutantes de FlbB</b> .....	103
3.1 Expresión dirigida de FlbB .....	103
3.2 Sobreexpresión de FlbB en ausencia de FlbE .....	107
3.3 Papel de la cisteína C382 en la formación del complejo apical .....	109
3.4 Estudio de la distribución subcelular de FlbB .....	113
<b>4.- Factores que influyen en la expresión de <i>brlA</i></b> .....	118
4.1 FlbD .....	118
4.2 La enzima glucosa-metanol-colina oxidorreductasa, GmcA .....	119
<b>5.- Inductores adicionales de la conidiación</b> .....	128
5.1 Luz .....	128
5.1.1 Producción de esterigmatocistina .....	130
5.1.2 Cuantificación de la formación de estructuras de reproducción sexual y asexual .....	131
5.2 Oxilipinas .....	135
5.2.1 El 1-octen-3-ol actúa como inhibidor del crecimiento y la germinación .....	135
5.2.2 La oxilipina 3-octanona es la principal inductora de la conidiación .....	139

## DISCUSIÓN

---

<b>1.- Formación del Complejo Apical .....</b>	<b>143</b>
<b>2.- Regulación de la actividad de FlbB .....</b>	<b>150</b>
2.1 Posibilidad de la formación de complejos multiproteicos para la unión de FlbB a los promotores bajo su regulación .....	150
2.2 Dianas de unión de FlbB .....	153
2.2.1 La autorregulación transcripcional de FlbB .....	153
2.2.2 El papel regulador del c-Myb FlbD .....	154
2.2.3 La regulación negativa de la oxidoreductasa GmcA involucrada en conidiación .....	156
2.3 Papel de FlbB en la regulación del ciclo sexual .....	157
<b>3.- Señales inductoras de la conidiación .....</b>	<b>157</b>
3.1 La luz .....	157
3.2 Las oxilipinas .....	158
<b>4.- Un nuevo modelo del circuito que regula a la ruta central de la conidiación .....</b>	<b>159</b>
4.1 Actualización del modelo de la ruta UDA .....	159
4.2 Modelo celular .....	160

## CONCLUSIONES

---

<b>Conclusiones .....</b>	<b>167</b>
---------------------------	------------

## BIBLIOGRAFÍA

---

<b>Bibliografía .....</b>	<b>171</b>
---------------------------	------------



# **INTRODUCCIÓN**



## **1.- Información general sobre *Aspergillus nidulans***

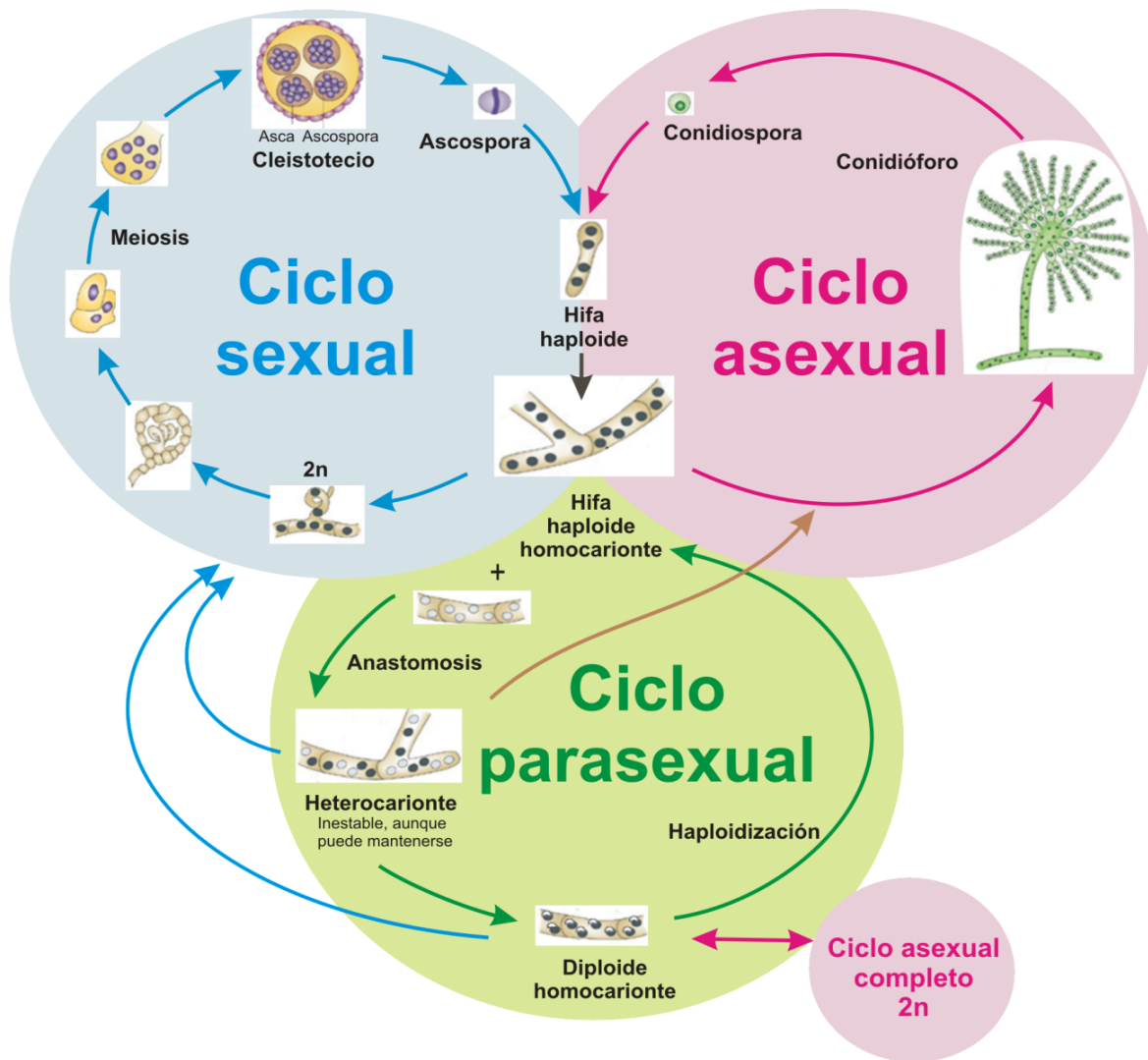
*Aspergillus nidulans*, nombre de su forma anamorfa o *Emericella nidulans* como forma teleomorfa, es un hongo filamentoso ascomiceto, del subfilo Pezizomicotina, perteneciente a la clase Eurotiomicetos y a la orden Eurotiales, más concretamente a la familia Trichocomaceae (Pontecorvo *et al.*, 1953; Thom and Raper, 1945). Su genoma de 30 millones de pares de bases está organizado en 8 cromosomas y alberga alrededor de 10000 genes (Galagan *et al.*, 2005). Su secuencia está disponible en el Broad Institute ([http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus\\_group/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/MultiHome.html)) o en la base de datos del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (<http://www.aspergillusgenome.org/>).

*A. nidulans* es un modelo genético de referencia, puesto que permite aplicar los conocimientos adquiridos en este hongo en otros miembros de su género de gran interés económico, como *A. oryzae* o *A. flavus*, o en hongos de interés clínico, como *A. fumigatus*. Su capacidad para formar esporas sexuales mediante meiosis, su carácter homotálico (Dyer *et al.*, 2003) y su fácil manipulación en estudios genéticos y de biología celular han permitido su uso como modelo experimental para alcanzar una mejor comprensión en varios procesos biológicos. También ha sido objeto de estudios relacionados con la recombinación y reparación del DNA, el control del ciclo celular, así como de las rutas pertenecientes a los metabolismos primario y secundario y su regulación a nivel transcripcional o postranscripcional (Nierman *et al.*, 2005).

Un aspecto esencial para comprender la utilidad en investigación de este hongo filamentoso es que el ciclo de vida de *Aspergillus* puede dividirse en cuatro estadios bien diferenciados (Adams *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 2007b; Todd *et al.*, 2007a): crecimiento vegetativo, reproducción asexual, reproducción sexual y ciclo parasexual (figura I-1).

El estadio de crecimiento vegetativo del hongo comienza con la germinación de la conidiospora o espora de reproducción asexual en la que se ha establecido el punto de polaridad de la célula (Harris and Momany, 2004).

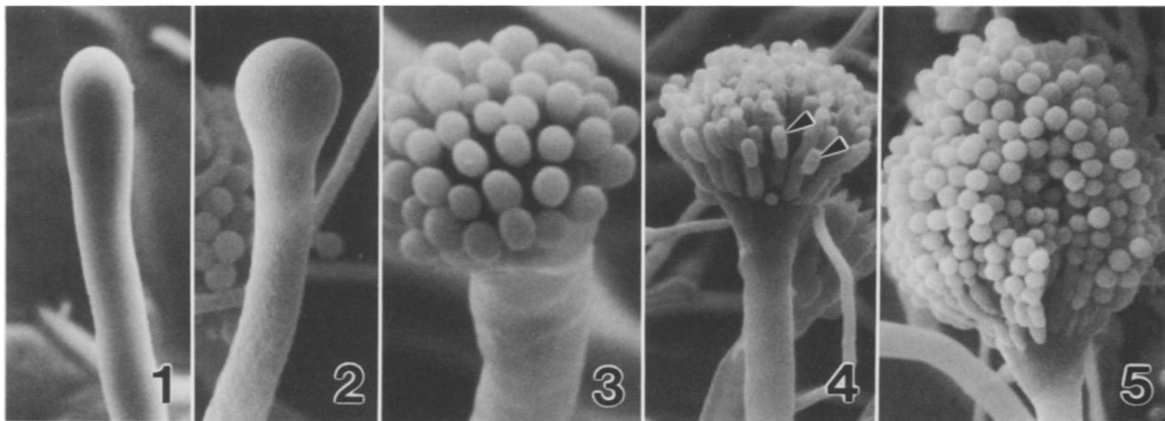
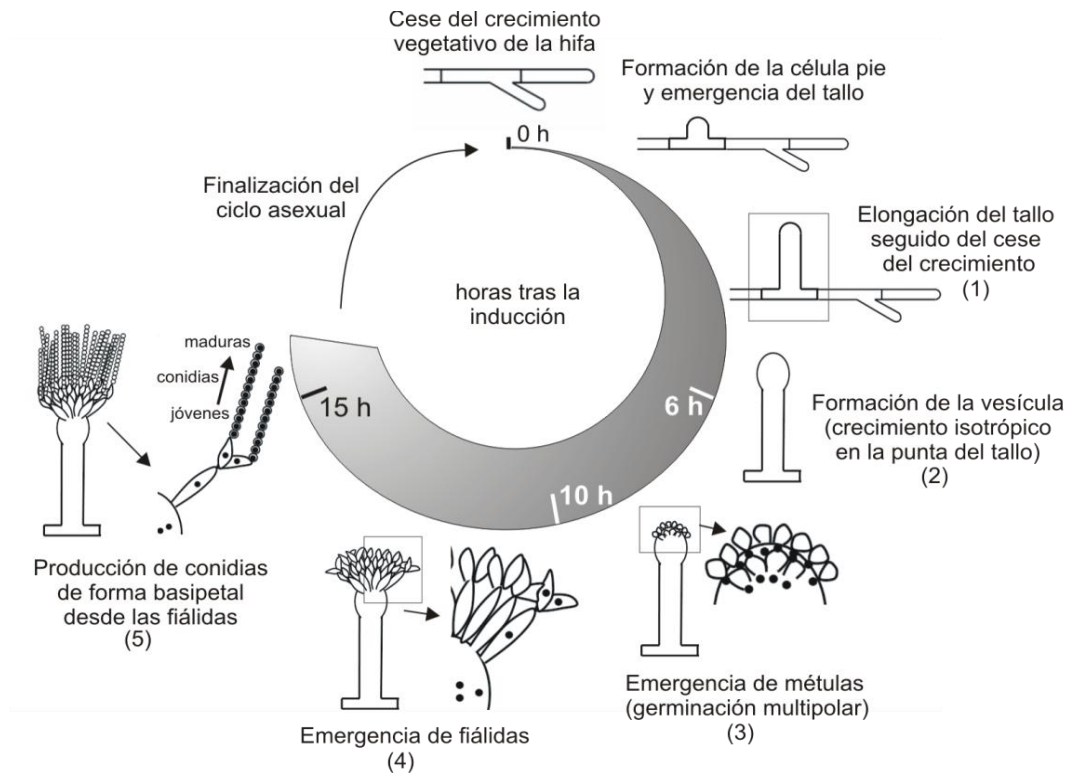




**Fig. I-1: Ciclos de vida de *Aspergillus nidulans*.** Las distintas fases y células que se producen dentro de cada ciclo de vida se enmarcan con fondos de diferentes colores. El ciclo sexual está mostrado sobre fondo azul y se detallan los pasos más importantes que terminan en la producción de las ascosporas que siempre son binucleadas y con dosis genética  $n$ . Las ascosporas están contenidas dentro de las ascas y éstas a su vez en los cuerpos fructíferos llamados cleistotecios. El ciclo asexual está representado sobre fondo lila. Dado que más adelante se detalla el proceso de formación del conidióforo, aquí sólo se representa dicha estructura que culmina con la formación de las conidiosporas o esporas asexuales. Éstas pueden ser  $n$  o  $2n$ , si provienen de un micelio haploide o heterocariótico (flecha marrón), en el primer caso, o diploide, en el segundo. Este último está indicado en la parte inferior de la figura como ciclo asexual completo  $2n$ . En cualquier caso las conidiosporas son siempre mononucleadas lo que permite el rápido establecimiento de fondos genéticos homogéneos. El ciclo indicado en verde es el parasexual, fácilmente inducido en el laboratorio cultivando dos cepas cuyos genotipos son compatibles en medio selectivo para ambas. La cariogamia o fusión de núcleos dentro del heterocarionte da lugar al diploide, el cuál es estable mientras se mantengan las condiciones restrictivas en el medio de cultivo que permitieron la formación del heterocarionte. El cultivo del diploide en un medio rico o la presencia de agentes desestabilizantes de microtúbulos como el benomilo causan la incorrecta segregación cromosómica, dando lugar a estadios aneuploides que son muy inestables y que terminan con la selección de núcleos con la dotación genética  $n$ . Este proceso se denomina haploidización. La pérdida de cromosomas es, en principio, aleatoria por lo que se puede llegar a alcanzar una variabilidad genética comparable con la de los descendientes de un proceso de división meiótico.

Las células vegetativas se denominan hifas, son tubulares y crecen de manera hiperpolarizada por extensión apical y ramificación lateral (Harris *et al.*, 2005) desplazando hasta cada ápice las diferentes maquinarias moleculares requeridas para este tipo de crecimiento celular (D'Enfert, 1997; Osherov and May, 2001). Las hifas se entrecruzan y pueden llegar a fusionarse (anastomosis), lo que no es frecuente en *A. nidulans*, formando una red entramada denominada micelio que se expande radialmente formando colonias circulares. *Aspergillus* es un organismo cenocítico, en el cual las células vegetativas son sincitios multinucleados, habitualmente haploides, y están divididas en compartimentos mediante septos perforados que permiten el intercambio selectivo de nutrientes y efectores entre éstos. Generalmente, en las hifas de una colonia todos los núcleos contienen el mismo material genético, salvo las ascosporas contenidas en los cleistotecios en el caso de los diploides, y por ello a estas cepas se las denomina homocariontes. En las hifas de los heterocariontes conviven en un mismo citoplasma núcleos con dotación genética diferente aunque en las células diferenciadas del conidióforo o en las pertenecientes a otras estructuras reproductivas, esta situación puede ser diferente (Glass *et al.*, 2000).

La formación de estructuras de reproducción asexual comienza cuando determinadas células, por detrás de la zona de expansión o crecimiento activo de la colonia, emergen al aire. La luz también juega un papel muy importante y ambos factores, aire e iluminación, se coordinan para iniciar un proceso de diferenciación celular que dará lugar a la formación del conidióforo, la estructura característica del ciclo de desarrollo asexual (Adams *et al.*, 1998). El proceso de formación de un conidióforo tiene lugar en varios pasos de diferenciación celular. Éste comienza con la formación de una célula pie, seguida de la aparición del tallo, que es una ramificación de la anterior, y la formación de la vesícula tras la expansión de la parte apical del tallo ocasionada por la parada del crecimiento polarizado. Sobre la vesícula surgen por un proceso de división multipolarizado las métulas o esterigmatas primarias. Sobre las métulas se produce la formación de las fiálidas, normalmente dos por métula. Finalmente, sobre cada fiálida se produce una cadena de esporas mononucleadas a consecuencia de un proceso de división basípeta, donde la fiálida es la célula esporogénica (figura I-2).



**Fig. I-2: Proceso de formación del conidióforo.** Este proceso de desarrollo y diferenciación celular comienza con la aparición sobre la célula pie del tallo (1) lo que implica la emergencia al aire. La punta del tallo se modifica y deja de crecer de forma polarizada para hacerlo isotrópicamente apareciendo la estructura denominada vesícula (2). Sobre la vesícula crecen las métulas (3) y sobre cada una de ellas habitualmente dos fiálidas (4). Seguidamente, las fiálidas, que son las células esporogénicas, producen cadenas de conidias de forma basipetal de manera que las conidias más jóvenes se sitúan cerca de la fiálida (5). El panel superior muestra un esquema temporal de la aparición de las diferentes células especializadas, modificado a partir de Etxebeste et al. 2010. En el panel inferior se ilustra con imágenes de microscopía electrónica de barrido cada uno de los principales estadios de desarrollo y la formación de las estructuras o células características. Las imágenes provienen de Mims et al, 1988.

La conidiación puede inducirse, además de por la emergencia al aire de las hifas, por otras condiciones ambientales incompatibles con el crecimiento vegetativo, como el estrés nutricional, salino u osmótico (Calvo, 2008; Etxebeste *et al.*, 2009; Skromne *et al.*, 1995). El desarrollo del conidióforo exige, muy probablemente, profundos cambios en el patrón de expresión génica y en el metabolismo de la colonia, con un gran incremento en la producción de metabolitos secundarios y la activación de un proceso autolítico en las hifas que rodean el conidióforo, presumiblemente proporcionando los recursos celulares necesarios a las nuevas estructuras en desarrollo (Calvo, 2008; Emri *et al.*, 2008). El desarrollo del conidióforo se analizará en mayor detalle en el siguiente apartado.

El carácter homotálico de *A. nidulans*, es decir, la posesión de dos genes de apareamiento (HMG y  $\alpha$ ) permite el cruce sexual de dos cepas diferentes o incluso el de dos células de la misma colonia. Este proceso que tiene lugar en las zonas maduras de la colonia comienza tras la fusión por anastomosis de dos hifas homocarióticas generando una célula heterocariótica. Los distintos núcleos se fusionan y se genera un núcleo diploide transitorio en una estructura característica llamada *crozier* para a continuación dividirse por meiosis dando lugar a cuatro productos meióticos. Éstos a su vez, se dividen mitóticamente resultando en 8 ascosporas dentro de una misma asca. Antes de que las ascosporas maduren totalmente acontece una nueva división nuclear pero no celular. Debido a este proceso cada asca madura contiene 8 ascosporas binucleadas y haploides. El cuerpo fructífero donde se encuentra el conjunto de ascas recubiertas por una pared es una estructura esférica denominada cleistotecio y se encuentra habitualmente rodeada de grupos de células llamadas células Hülle. Cuando el cleistotecio se rompe, las 10000 ascosporas que puede llegar a contener (Todd *et al.*, 2007b) se liberan y germinan, comenzando así un nuevo ciclo de vida vegetativo (Pontecorvo *et al.*, 1953).

El ciclo parasexual se caracteriza por la fusión de hifas vegetativas y el intercambio de material celular por anastomosis, dando lugar a individuos heterocarióticos que poseen núcleos haploides de distinta dotación genética. Adicionalmente se puede producir la fusión de los núcleos haploides para dar lugar a estirpes diploides. La dotación cromosómica  $n$  se restablece por haploidización (Pontecorvo *et al.*, 1953).

## **2.- Programación genética del desarrollo**

Las condiciones ambientales pueden ser determinantes en la transición entre el crecimiento vegetativo y la reproducción asexual. Entre ellas destacan la emergencia al aire de las hifas, su exposición a la luz o algunos estreses como el nutricional, salino u osmótico (Calvo, 2008; Etxebeste *et al.*, 2009; Skromne *et al.*, 1995). El desarrollo asexual precisa además de la aparición del estímulo, de la adquisición de la competencia para dicho proceso por parte del hongo (Hadley and Harrold, 1958). La formación del conidióforo exige profundos cambios en el metabolismo de la colonia, con el incremento de la producción de metabolitos secundarios y la activación de un proceso autolítico como se ha citado previamente (Calvo, 2008; Emri *et al.*, 2008).

### **2.1 Descripción física**

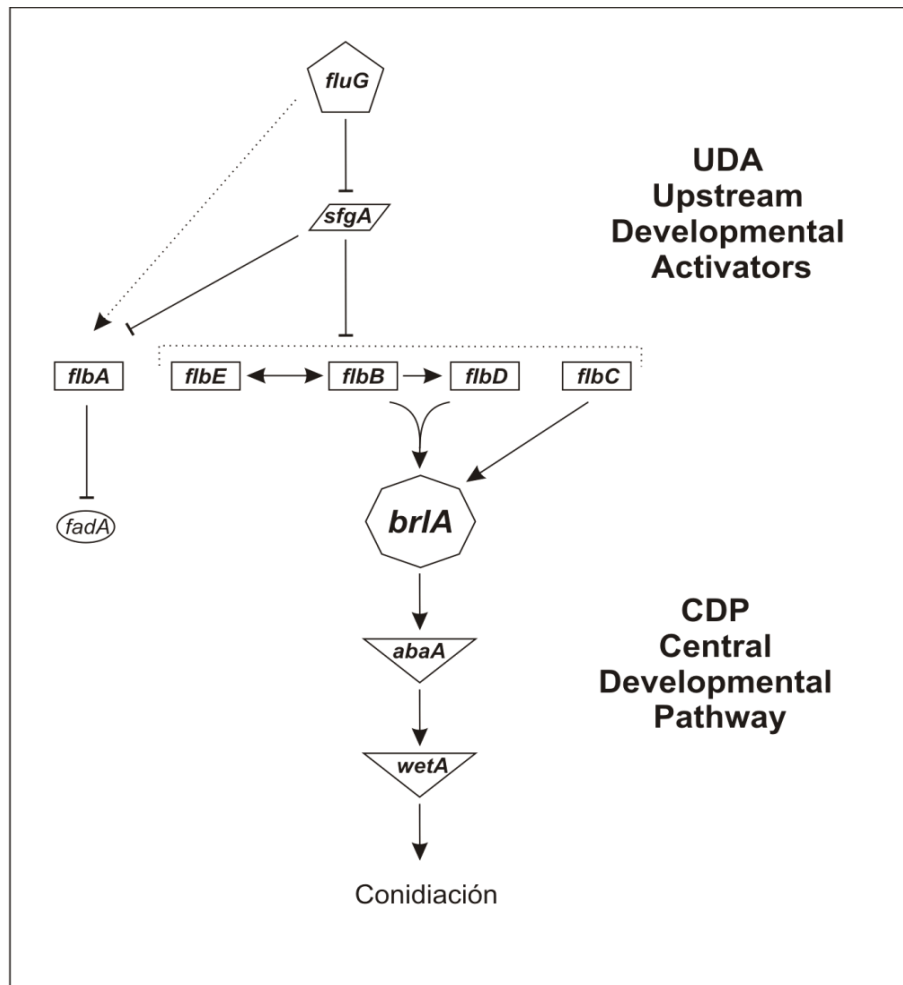
Los diferentes estadios celulares que dan lugar al conidióforo requieren de una combinación de crecimiento isotrópico y polar, salvo en el caso de la conidia. El proceso se inicia con el ensanchamiento de la pared de una hifa específica, dando lugar a la célula pie. El tallo emerge a partir de ésta como una pseudohifa, 1-2µm más ancha que una hifa vegetativa, y se elonga hasta una longitud media de 100µm mostrando un geotropismo negativo. Aproximadamente 6 horas después de la inducción de la conidiación, el crecimiento polarizado de la célula del tallo se para y comienza un crecimiento isotrópico en la punta de esta célula que da lugar a una estructura globular conocida como vesícula. Ésta suele alcanzar los 10µm de diámetro y servirá de base para el posterior desarrollo de las métulas. El tallo y la vesícula no muestran ningún septo ni ramificación, lo que no impide a la vesícula albergar múltiples divisiones nucleares, produciéndose hasta 60 núcleos en su interior (Mims *et al.*, 1988). Estos núcleos se distribuyen bajo la superficie de la vesícula de manera homogénea y comienza una germinación multipolar que da lugar a las métulas. Una vez que un único núcleo ha entrado en cada métula, se forma un septo que las separa de la vesícula. 10h después de la inducción de la conidiación, cada métula experimenta una división especializada para dar lugar por gemación a dos nuevas células que tras un proceso de maduración se convertirán en las fiálidas. Estas células especializadas producen una larga cadena de conidias de forma basipetal, es decir,

produciendo las conidias jóvenes en las posiciones más cercanas a la fiálida. Los conidióforos maduros se forman 15 horas después de la inducción del proceso de conidiación (Ettxebeste *et al.*, 2010).

## 2.2 Descripción genética

La formación del conidióforo está supeditada a la expresión de los genes de la ruta central del desarrollo o **central developmental pathway** (CDP), cuyo elemento central es el gen *brlA*, activado exclusivamente una vez inducida la conidiación y el cual regula la expresión de múltiples genes específicos de esta ruta situados corriente abajo. Previa a la expresión de *brlA*, se encuentra un conjunto de genes, conocidos como genes de inducción temprana (**upstream developmental activators**, UDA) que están activos desde las fases iniciales de la reproducción asexual, incluso en las hifas vegetativas (Ettxebeste *et al.*, 2010). Estos genes activan la CDP y sus alelos nulos causan un fenotipo aconidial en las cepas que los portan, demostrando su gran importancia en este proceso. Este conjunto de genes incluye a *fluG*, *sfgA*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (figura I-3).

Las cepas *fluG* mutantes, además de mostrar un fenotipo *fluffy* o no conidiante, no producen un metabolito, conocido como el factor de FluG, que se acumula en las hifas aéreas y señala el inicio del proceso de conidiación. Aun así, este factor puede difundirse y ser transferido desde una colonia silvestre adyacente a una colonia mutante *fluG*-, restableciendo así su capacidad de conidiación (Lee and Adams, 1994b). Este factor dependiente de FluG actúa, entre otros efectos, como supresor del factor de transcripción SfgA, FT de tipo dedos de zinc, el cual reprime la conidiación y promueve el crecimiento vegetativo. Además, el factor de FluG es necesario para la producción de la micotoxina esterigmatocistina (Seo *et al.*, 2006). Recientemente, se ha descubierto que la naturaleza química de este factor es un aducto compuesto por el deshidroaustinol y el diorcinol (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012) como se detalla en la sección 7 de esta misma introducción, sin embargo aún se desconoce cómo estos compuestos median su acción en el sistema de señalización de la conidiación.



**Fig. I-3: Modelo de la ruta de la conidiación.** En el texto se detallan las características de cada uno de los factores pertenecientes a la ruta UDA. Esta ruta converge en la regulación de la expresión del factor *brlA*, el gen maestro cuyo producto desencadena la activación de la ruta central del desarrollo, abreviado como CDP, del inglés Central Developmental Pathway. Indicar que la mayoría de los componentes identificados en estas rutas son factores transcripcionales con diferentes dominios de unión a DNA, como SfgA (supresor de *FluG*), FlbB (Fluffy low bristle expression), FlbD, FlbC, BrlA (Bristle), AbaA (Abacus) y WetA (Wet).

Los genes *flb* reciben su nombre debido al fenotipo *fluffy* y la baja expresión de *brlA*, bristle, que muestran sus mutantes nulos (*fluffy*, low bristle expression). Éstos fueron parcialmente caracterizados hace aproximadamente 15 años (Adams *et al.*, 1998) y además de activar la ruta CDP, se describió su participación en la producción de un segundo metabolito necesario para la inducción de la conidiación. En aquellos estudios se determinó la posición de cada producto Flb en la ruta CDP tras los resultados de

experimentos genéticos de epistasia, el estudio del fenotipo de mutantes simples y dobles, o experimentos de sobreexpresión. Inicialmente se ordenaron y se situó a *flbB*, *flbD* y *flbE* en una misma ruta o rama de la ruta principal CDP, mientras que *flbA* y *flbC* actuaban independientemente entre sí y sin una conexión directa con la ruta anterior, aunque el conjunto de los Flbs actúan de forma coordinada sobre el objetivo final que es *brlA*. Los genes *flbB*, *flbD* y *flbE* han sido recientemente estudiados en profundidad en nuestro grupo, y *flbC* se ha caracterizado en colaboración con el laboratorio del Dr. J.H. Yu, aportando datos importantes para una mejor comprensión de estos UDAs. Todos ellos se describen a continuación.

FlbA es un regulador de la señalización de las proteínas G y su sobreexpresión activa la expresión de *brlA* y permite la aparición de estructuras tipo conidióforo en cultivos sumergidos (Lee and Adams, 1994a). Sin embargo, en cepas portadoras del alelo nulo de *fluG*, la sobreexpresión de *flbA* no es capaz de formar estas estructuras, lo que sugiere que FlbA está estrechamente relacionada con el producto de FluG (Lee and Adams, 1996). Esta proteína citoplásmica inhibe el crecimiento y promueve la conidiación y la producción del metabolito secundario esterigmatocistina a través del bloqueo de la proteína G FadA en condiciones de inducción de la esporulación (Yu, 2006).

FlbB es un factor transcripcional de tipo bZIP compuesto por 426 aminoácidos que presenta una localización muy característica, puesto que se sitúa en la punta de la hifa y en el núcleo más apical en las hifas vegetativas (Etxebeste *et al.*, 2008). Durante mitosis, FlbB se mantiene en la punta de la hifa durante todo el proceso mientras que su localización nuclear se pierde, recuperándose en la fase G1 en el núcleo hijo apical. En células de un micelio que ha sido expuesto al aire tras haber crecido en medio líquido se puede observar a FlbB en la mayoría de los núcleos, sin embargo, pierde esta localización preferentemente nuclear en aquellas células que se desarrollan durante la formación del conidióforo. En este proceso de diferenciación FlbB vuelve a observarse en aquellos puntos de la vesícula donde emergen las métulas, momento en el que se ha especulado que debe existir un punto de control sobre este proceso morfogénico (ver más adelante, (Etxebeste *et al.*, 2009)). El fenotipo de los mutantes *flbB*<sup>-</sup> es *fluffy*, tal y como



se ha citado previamente y a pesar de no mostrar defectos en el crecimiento radial de la colonia, sí se ve afectada su ramificación, siendo ésta mucho más densa en los mutantes. Además, se ha descrito un fenotipo autolítico para estos mutantes bajo estrés osmótico producido por sacarosa o sorbitol (Etxebeste *et al.*, 2009). También se ha demostrado la capacidad de unión a DNA del dominio bZIP de FlbB y el reconocimiento de secuencias diana similares a las descritas previamente para los factores bZIP de la familia AP-1. Por otro lado se ha hipotetizado sobre el posible papel de FlbB en la transición de métula a fiálida, actuando como un posible punto de control en este proceso de diferenciación celular, dado que es posible producir pseudohifas a partir de métulas si concurren las condiciones adecuadas para un crecimiento vegetativo (Etxebeste *et al.*, 2009). Este hecho, demuestra que el proceso de conidiación no es irreversible como se pensaba anteriormente. Además de todos estos datos, hemos encontrado que FlbB forma un complejo con FlbE en lo que se ha denominado Complejo Apical. Éste será descrito en el siguiente apartado y estudiado en profundidad a lo largo de esta tesis.

FlbE es una proteína con una distribución filogenética reducida dado que es específica de hongos filamentosos. Esta proteína consta de 202 aminoácidos y presenta en su estructura primaria, al compararla con sus posibles homólogos, cinco regiones conservadas cuya función aún no ha sido definida. Entre ellas destaca una región rica en aminoácidos de carácter ácido en su extremo C-terminal (Cortese *et al.*, 2011). Desde los primeros análisis genéticos se evidenció una relación funcional entre FlbB y FlbE. El mutante nulo *flbE* presenta un fenotipo aconidial, indistinguible del mutante nulo de *flbB* y el estrés salino puede inducir la conidiación de  $\Delta flbE$ , igual que ocurría con  $\Delta flbB$  (Garzia *et al.*, 2009). Además el doble nulo no es aditivo y la sobreexpresión de FlbE no revierte el fenotipo aconidial de la cepa  $\Delta flbB$ , ni la sobreexpresión de FlbB el fenotipo de  $\Delta flbE$ . FlbE se acumula en la punta de la hifa y se expresa a lo largo de todo el ciclo celular, tanto en hifas vegetativas como en estructuras asexuales y sexuales. No hay evidencia de que FlbE sea un factor transcripcional ni acompañe a FlbB o a otro Flb al núcleo, por lo tanto su papel principal se centraría en la formación del complejo apical y posible señalización de FlbB ante el estímulo que desencadene el inicio de la diferenciación asexual.

FlbD es un factor de transcripción tipo c-Myb formado por 315 aminoácidos. Este FT se localiza en todos los núcleos en hifas vegetativas pero no se observa su acumulación en los núcleos de células pertenecientes a los diferentes estadios de la formación del conidióforo. La delección de este gen provoca el fenotipo *fluffy* de la cepa mutante, mostrando pequeñas diferencias en la producción de esporas respecto a los nulos de *flbB* y *flbE*. Además, el doble mutante  $\Delta flbB \Delta flbD$  presenta un fenotipo más aconidial que cada uno de los mutantes simples, sugiriendo un efecto aditivo de ambos factores en la ruta de inducción de *brlA* y por tanto, descartando la ruta lineal *flbD-flbE-flbB* que se había establecido hasta el momento (Garzia *et al.*, 2010). *flbD* exhibe un patrón de expresión similar al de *flbB* y se ha descubierto que se requiere el Complejo FlbB/FlbE funcional para una correcta expresión de *flbD*. Además, el FT FlbB se une al promotor de *flbD in vitro* y a su vez, FlbB y FlbD se unen a secuencias muy próximas en el promotor de *brlA* regulando así conjuntamente la expresión de este factor (Garzia *et al.*, 2010).

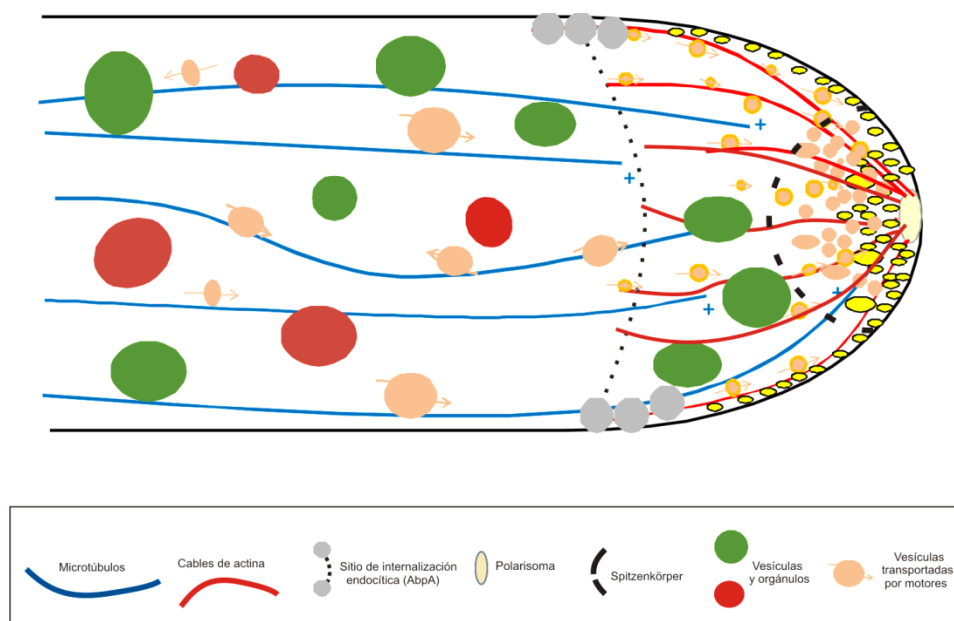
FlbC es un factor transcripcional de tipo dedos de zinc  $C_2H_2$  compuesto por 354 aminoácidos que ha sido recientemente caracterizado por otro miembro del grupo en colaboración con el laboratorio del Dr. J.H. Yu. Al igual que los otros *flb*, su delección causa un retraso y una reducción en la conidiación debida a la bajada en la expresión de *brlA*. El papel de este factor puede ir más allá de la mera expresión de *brlA* dado que su sobreexpresión causa la inhibición del crecimiento vegetativo y de la conidiación. Este FT presenta una localización nuclear con una distribución homogénea entre todos los núcleos en hifas vegetativas y también en las células diferenciadas asexualmente. FlbC es, en apariencia, un elemento aislado puesto que tanto su localización como su expresión son independientes de FlbB y FlbE. Sin embargo, está al mismo nivel regulador que FlbB y FlbD, dado que se ha demostrado que FlbC es capaz de unirse al promotor de *brlA in vitro*, así como a los promotores de *abaA* y *vosA*, genes situados corriente abajo de *brlA* en la ruta de la conidiación (Kwon *et al.*, 2010a).

### **3.- El Complejo Apical está formado por FlbB y FlbE**

FlbE y FlbB tienen en común la localización preferente, desde células muy jóvenes, en el ápice del tubo hifal. El etiquetado de cada una de las dos proteínas con epítomos fluorescentes diferentes, GFP-FlbB y FlbE-CherryRed, permitió demostrar que FlbB y FlbE colocalizan en la punta de la hifa. Se ha observado que la localización de ambas es interdependiente, ya que no se detecta la acumulación en el ápice de FlbE en ausencia de *flbB*, ni la de FlbB en una célula mutante  $\Delta flbE$ . Gracias al ensayo de Complementación de Fluorescencia Bimolecular (BiFC) se ha demostrado la proximidad que existe entre FlbB y FlbE al reconstituirse la proteína fluorescente YFP a partir de los dos fragmentos que la dividían y que estaban etiquetando cada una de los factores Flb. Además de mostrar de forma definitiva la colocalización de estas dos proteínas Flb, se evidenciaba la existencia de una interacción entre ambas, a la cual se ha denominado Complejo Apical (Garzia *et al.*, 2009).

AbpA, actin-binding-protein, se sitúa en la célula asociada a la actina y a los complejos proteicos que marcan los puntos de endocitosis (Araújo-Bazán *et al.*, 2008). La maquinaria endocítica está altamente polarizada en *A. nidulans* y antecede a otra estructura puramente fúngica, el *Spitzenkörper* (Steinberg, 2007). La colocalización de AbpA y FlbB muestra que el FT se acumula más allá de esta maquinaria molecular, es decir el Complejo Apical se sitúa dentro o en la proximidad del *Spitzenkörper* (Etxebeste *et al.*, 2009). El *Spitzenkörper* es un cuerpo apical próximo a la maquinaria requerida para el crecimiento polarizado, polarisoma y para la exocitosis (Harris *et al.*, 2005; Taheri-Talesh *et al.*, 2008). Sus movimientos dirigen el crecimiento en la punta (Riquelme *et al.*, 2000) y resulta esencial para el crecimiento polar (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). En el *Spitzenkörper* se acumulan multitud de vesículas que son transportadas hasta el ápice por maquinaria asociada a microtúbulos y se mueven dentro del *Spitzenkörper* gracias a los microfilamentos de actina y proteínas asociadas (Harris *et al.*, 2005). En el *Spitzenkörper* se pueden encontrar multitud de ribosomas o vesículas que provienen del aparato de Golgi mediante un proceso de exocitosis controlada. También, y dependiendo del hongo, se han encontrado factores implicados en un correcto crecimiento polar que son trasladados

a los puntos de polarización en forma de mRNA y que son traducidos *in situ* (Inglis & Johnson, 2002, Becht *et al.*, 2006, Aronov *et al.*, 2007, Zarnack & Feldbrügge, 2007). Adicionalmente, existe un complejo proteico en el ápice de la hifa que regula la polarización de la célula. Este complejo llamado Polarisoma dirige los filamentos de actina a los puntos donde se debe producir la polarización del crecimiento de la célula, haciendo que la célula al crecer pueda cambiar su dirección y evitar ambientes hostiles u otras células y dirigirse hacia ambientes más apropiados para el desarrollo del hongo (figura I-4).



**Fig. I-4: Diagrama simplificado de la organización subcelular de la punta de la hifa en *Aspergillus nidulans*.** El compartimento celular apical presenta una organización diferente al resto de compartimentos del micelio. En especial en la región más apical se concentran diferentes complejos macromoleculares que son esenciales para el mantenimiento de la morfología celular. El posicionamiento de la maquinaria de exocitosis junto con el Polarisoma en la punta de la hifa dan lugar al depósito de membranas y materiales exclusivamente en esa parte de la célula. Las vesículas con los componentes de pared, enzimas, transportadores y otros elementos estructurales son transportados hasta esa localización celular gracias a los citoesqueletos de tubulina o actina, y a los motores moleculares que los utilizan (miosinas, quinesinas, dineína, etc). El citoesqueleto de actina se encarga de mantener la organización del ápice. El conjunto de cables de actina, vesículas de diferente naturaleza y el propio polarisoma componen el *Spitzkörper* que es considerado como un orgánulo específico de hongos. El crecimiento polarizado requiere de estas estructuras y del posicionamiento de la maquinaria de endocitosis que recupera el exceso de material membranoso y proteínas asociadas. El factor FlbB se sitúa más allá de la zona donde se localiza la maquinaria de endocitosis (círculos grises) dentro de esta estructura dinámica denominada *Spitzkörper* (línea discontinua). Modificado a partir de poster de A. Pantazopoulou.

El citoesqueleto de actina determina la localización y/o formación del Complejo Apical. La utilización de drogas como la latrunculina B o el benomilo, que desestabilizan los filamentos de actina o los microtúbulos, respectivamente, han permitido demostrar el papel esencial de la actina en la distribución celular de FlbB y FlbE. Estos resultados evidenciaban la estrecha relación entre el Complejo Apical y el *Spitzenkörper* aunque no se ha demostrado la colocalización con componentes específicos de este orgánulo (Garzia et al, 2009).

#### **4.- Identificación de *flbB* y *flbE* y sus mutantes clásicos**

En esta introducción se han descrito brevemente hasta ahora estos dos genes, pero ¿cómo fueron redescubiertos e identificados por nuestro grupo?

Tras un proceso de mutagénesis con nitrosoguanidina llevado a cabo con el objetivo de encontrar nuevos genes implicados en la regulación de la conidiación, se analizaron 35000 colonias de las que se aislaron diferentes mutantes aconidiales o *fluffy*. A continuación se procedió a un segundo tamizado selectivo de los mismos. Se seleccionaron aquellos mutantes *fluffy* que fueron capaces de esporular en la zona de contacto con una colonia de una cepa silvestre. Asimismo se les exigió que indujesen mediante contacto de colonias el proceso de conidiación en una cepa  $\Delta fluG$ , sin que por el contrario, fueran capaces de complementarse entre ellos. Se seleccionaron los cuatro mutantes que cumplían todos estos requisitos y a continuación fueron analizados en profundidad. Los cuatro mutantes fueron denominados BD11, BD12, BD13 y BD14. Mediante un análisis genético clásico se descubrió que las mutaciones se localizaban en dos *loci* diferentes que fueron identificados como *flbB* y *flbE* (Etxebeste et al., 2008; Garzia et al., 2009). Mientras que las cepas BD11, BD12 y BD14 contenían formas alélicas mutantes de *flbB*, la cepa BD13 portaba un alelo mutante de *flbE* (Etxebeste et al., 2008; Garzia et al., 2009).

La cepa BD11 es portadora del alelo mutante *flbB102*. En este alelo hipofuncional de *flbB* hay dos mutaciones en la región codificante, la sustitución C1255T y la delección

C1257Δ. Estas mutaciones dan lugar al reemplazo del residuo P305 por una leucina (P305L) y a un cambio en la fase de lectura a partir del triplete que codifica para P305L, por el que se insertan otros 36 aminoácidos fuera de fase hasta el codón de parada más cercano. La cepa BD12 porta el alelo mutante *flbB101* cuya mutación es la sustitución G1143A, que causa el truncamiento de la proteína en el residuo 267 tras el que se insertan 4 residuos fuera de la fase de lectura. La cepa BD14 porta el alelo mutante *flbB100*, con una sustitución G456A a nivel de DNA. A consecuencia de ello, el residuo 70 de glicina es sustituido por una arginina (Etxebeste *et al.*, 2008).

Cepa	Alelo	Cambios en el DNA	Proteína mutante	Cambios en la proteína
BD11	<i>flbB102</i>	C1255T, Δ1257	1-304 + L-35	P306 fs
BD12	<i>flbB101</i>	G1143A	1-267 + YVLR	L267 fs
BD14	<i>flbB100</i>	G456A	1-426	G70R

Fs: frameshift o cambio de fase, seguido de una terminación temprana.

En el mutante BD13, mutante del gen *flbE* y portador del denominado alelo *flbE001*, se identificó una doble sustitución en los nucleótidos 58 y 59 de la cadena de DNA, causando una alteración en la proteína en el residuo 20 (R20W) y un cambio de fase tras él. Además del mutante BD13, en el proceso de etiquetado de FlbE con un epítipo fluorescente, se aislaron transformantes que mostraban un fenotipo aconidial o *fluffy* similar al de la cepa nula *flbE*. Así, se caracterizaron 3 mutantes adicionales de pérdida de función para FlbE. Estos transformantes fueron denominados BD200, BD201 y BD202, portadores de los alelos mutantes *flbE101*, *flbE102* y *flbE103*, respectivamente. El alelo *flbE101* causa un truncamiento temprano en la proteína, en el residuo 10 exactamente, por lo que puede considerarse prácticamente como un alelo nulo. El *flbE102* causa una mutación puntual en la proteína, con el cambio S120P, mientras que el *flbE103* da lugar al cambio A131V en FlbE. El fenotipo aconidial observado en los 3 mutantes, además de en BD13, muestra que tanto los mutantes con truncamientos tempranos como los mutantes con cambios de residuos puntuales dan lugar a la pérdida de función de FlbE (Garzia *et al.*, 2009). Estos mutantes también impiden la formación del previamente descrito Complejo

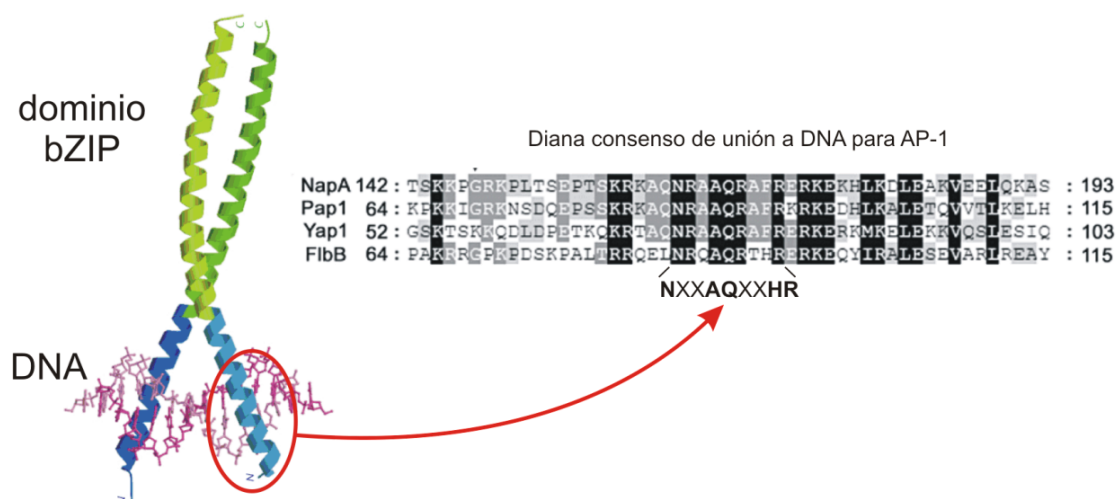
Apical, ya que tras demostrar en esta tesis que FlbB y FlbE son capaces de interaccionar *in vitro* (ver sección de resultados), dicha interacción se pierde cuando se ensayan los mutantes de FlbE (Garzia *et al.*, 2010).

Cepa	Alelo	Cambios en el DNA	Proteína mutante	Cambios en la proteína
BD13	<i>flbE001</i>	C58T, G59Δ	1-20	R20fs
BD200	<i>flbE101</i>	C27T, C28T	1-9	R10stop
BD201	<i>flbE102</i>	T358C	1-202	S120P
BD202	<i>flbE103</i>	C391T	1-202	A131V

## **5.- El factor FlbB: estudios bioinformáticos y funcionales**

*flbB* está formado por 1624 pares de bases, de las cuales 1281 forman la secuencia codificante y comprende 5 exones y 4 intrones. Los intrones 2, 3 y 4 tienen un tamaño normal de 49pb, 46pb y 48pb respectivamente. Sin embargo, el intrón 1 es mucho más grande abarcando 200pb. La proteína FlbB se compone de 426 aminoácidos, una masa teórica de 46.8kDa y un punto isoeléctrico de 5.98. Presenta una región básica (rica en residuos de arginina y lisina) de tipo cremallera de leucina (bZIP) en su extremo N-terminal, lo que le confiere la propiedad de unirse al DNA y por tanto el ser clasificado como un factor de transcripción. La presencia de un dominio de unión a DNA tipo bZIP implica necesariamente la formación de un homo o heterodímero en este tipo de factores de transcripción para poderse unir correctamente al DNA (figura I-5). En particular el dominio bZIP de FlbB muestra una gran similitud en su secuencia de aminoácidos con el de la proteína Pap1 de *Schizosaccharomyces pombe* que pertenece a la familia "Activator Proteins", siendo AP-1 de células humanas uno de sus paradigmas (Lee *et al.*, 1987). Es particularmente interesante que los factores de la familia AP-1 descritos en hongos, tanto levaduriformes como filamentosos, participan en la modulación de la respuesta a estrés oxidativo (Asano *et al.*, 2007;Castillo *et al.*, 2002). De acuerdo con la similitud en las

secuencias de aminoácidos de FlbB y Pap1 dentro de la región de la  $\alpha$ -hélice que realiza el contacto directo con las bases nitrogenadas del DNA, se ha demostrado que FlbB es capaz de unirse *in vitro* a las mismas secuencias diana que Pap1 (Etxebeste *et al.*, 2009).



**Fig. I-5: FlbB contiene un bZIP como dominio de unión a DNA similar al de la familia de factores AP-1.**

El dominio bZIP consta de dos partes bien diferenciadas dentro de una larga hélice  $\alpha$ . En la imagen se observa una representación del dominio, con una región en verde que indica la zona de cremallera de leucinas (ZIPper) y en azul la región rica en residuos de carácter básico que unen al DNA (basic region), ambas forman el bZIP. Un dominio bZIP funcional implica la formación de un dímero, que puede ser formado por dos moléculas idénticas o diferentes. En la parte derecha de la figura se muestra un alineamiento múltiple de proteínas AP-1 fúngicas (NapA de *A. nidulans*, Pap1 de *S. pombe* y Yap1 de *S. cerevisiae*) y FlbB en la región que contacta con el DNA. Las cadenas laterales de los residuos indicados, NXXAQXXHR, son las encargadas de contactar directamente con las bases nitrogenadas del DNA.

Un alineamiento múltiple realizado con las posibles proteínas ortólogas de FlbB en otros hongos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *N. crassa*, *F. graminearum*...) ha permitido determinar la presencia de regiones conservadas que han sido la base para el estudio de FlbB a lo largo de esta tesis. De este modo, se observan 5 regiones conservadas en FlbB, además del ya citado dominio de unión a DNA bZIP (figura I-6). Estas regiones han podido ser delimitadas con exactitud, gracias a análisis informáticos más profundos en los que se han incluido posibles homólogos de FlbB procedentes de un mayor número de especies de hongos y se ha tenido en cuenta la presencia de FlbE en los genomas de éstos. En estos análisis se han seleccionado las



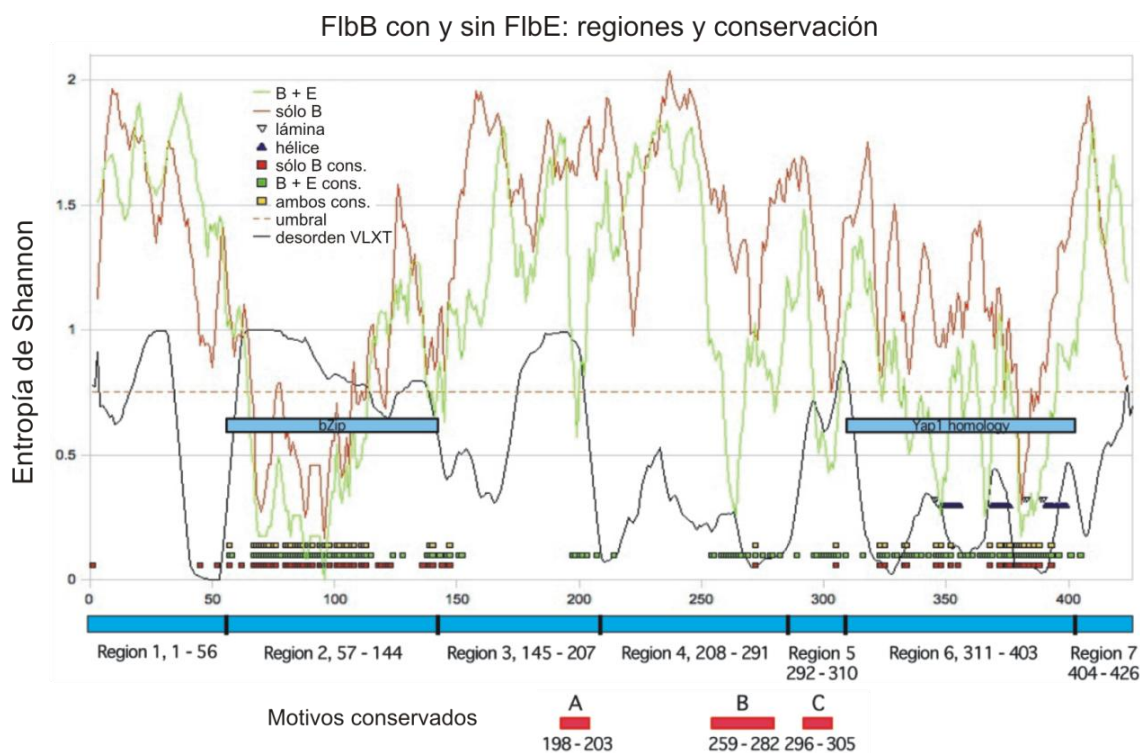
secuencias de proteínas con un mínimo de un 80% de similitud y unos valores de PSI-BLAST menores a  $1 \times 10^{-22}$  y  $7 \times 10^{-43}$  para FlbB y FlbE, respectivamente. También se ha restringido la selección a aquellas secuencias que mantienen todas las regiones conservadas, excluyendo las que presentan parte o sólo alguna de ellas. De la larga lista obtenida, se han seleccionado genomas que contienen genes que codifican para proteínas similares a FlbB y FlbE, para el alineamiento denominado “FlbB + FlbE”, mientras que las que sólo contienen genes que codifican para FlbB se incluyen en el grupo “sólo FlbB”. Así se agrupan genomas pertenecientes a 19 especies en el alineamiento “FlbB + FlbE” y genomas de otras 17 especies en el de “sólo FlbB”. Tras realizar el alineamiento múltiple con el programa ClustalW, las secuencias se han analizado mediante el cálculo de la entropía de Shannon. Estos cálculos muestran los diferentes grados de conservación en las regiones en las que se ha dividido FlbB, siendo la región del bZIP, residuos 67-115, la más conservada, tal y como se observa en la figura I-7. En el análisis de la entropía de Shannon se consideran regiones conservadas aquellas que tienen un valor por debajo de 1, siendo el grado de conservación máximo (identidad) cuando el valor es 0. La región homóloga a Yap1 de *S. cerevisiae* es la segunda región más conservada, pudiendo ser dividida a su vez en dos regiones, denominadas D y E, residuos 321-358 y 364-405, respectivamente. La zona central es la menos conservada, aunque en el alineamiento “FlbB + FlbE” pueden distinguirse determinados grupos de aminoácidos que están conservados. Éstas han sido denominadas regiones A, B y C, y comprenden los grupos de residuos entre las coordenadas 198-203, 259-282 y 296-305, respectivamente.



**Fig. I-6: Alineamiento múltiple de proteínas homólogas de FlbB.** El alineamiento múltiple permite definir las regiones conservadas de FlbB, cuyos límites fueron determinados gracias a estudios bioinformáticos más precisos. Las regiones definidas, y que posteriormente han sido estudiadas en esta tesis doctoral, son: el dominio de unión a DNA bZIP y las regiones conservadas denominadas A, B, C, D y E. El color verde oscuro indica identidad de secuencia y las otras dos tonalidades de verde (brillante y mate) indican la conservación en el aminoácido en dicha posición del 80% y 50%, respectivamente. La clasificación de la similitud de residuos en cada posición se ajusta a la matriz Blosom32. Abreviaturas en el alineamiento: A.nidu: *Aspergillus nidulans*, A.fumi: *Aspergillus fumigatus*, A.clav: *Aspergillus clavatus*, A.oryz: *Aspergillus oryzae*, A.nige: *Aspergillus niger*, A.terr: *Aspergillus terreus*, P.chry: *Penicillium chrysogenum*, M.oryz: *Magnaporthe oryzae*, C.immi: *Coccidioides immitis*, N. cras: *Neurospora crassa* y F.gram: *Fusarium graminearum*.

Tras este estudio, la revisión de las secuencias de los genes *flbB* y *flbE* por parte del Dr. Cortese, colaborador del grupo, para confirmar las fases de lectura abiertas (ORFs) y los intrones previamente definidos, ha incluido alguna pequeña modificación que una vez obtenida se ha tenido en cuenta para volver a extraer los motivos conservados de FlbB. En este caso, se han utilizado sólo los 9 genomas pertenecientes a las especies más parecidas a *A. nidulans* y la selección se ha basado tanto en información estructural como de entropía (entropía menor a 0.5). Los resultados obtenidos han sido modificados para incluir: características estructurales, como por ejemplo el bZIP o similitudes con el C-terminal de Yap1, altos niveles de conservación no reflejados en los datos de entropía o combinaciones de pequeñas zonas conservadas en fragmentos más grandes. De este modo, se han definido las siguientes regiones conservadas para FlbB: B1- residuos 57-152, B2- residuos 157-203, B3-residuos 253-310 y B4- residuos 311-405. Al comprobar la conservación de estos 4 motivos entre los 40 ortólogos de FlbB estudiados, se ha visto que B1, B3 y B4 están altamente conservados entre todos ellos, mientras que el motivo B2 se restringe al grupo de las 9 especies Eurotiales a las que se hace mención previamente (Cortese *et al.*, 2011).

Además de los estudios bioinformáticos para la definición de las regiones conservadas, el Dr. Cortese también ha predicho las posibles funciones de cada una de ellas. Para esta tesis, las regiones de interés son las que se describen a continuación. En primer lugar, el dominio bZIP además de ser el dominio de unión de DNA también podría actuar como dominio de dimerización. En segundo lugar, la región A de FlbB podría jugar un papel en la interacción con FlbE, ya que sólo está presente en los genomas denominados “FlbB + FlbE”. Finalmente, otra región de especial interés para este estudio es la región carboxilo terminal, ya que podría ser importante en la formación de puentes disulfuro debido a las cisteínas que incluye, jugando un papel en la interacción entre proteínas. Todas estas predicciones serán estudiadas en el capítulo de resultados de esta tesis.



**Entropía media de las regiones**

Región	Nº residuo FlbB	B + E	sólo B
Región 1	1-57	1.61	1.48
Región 2-bZIP	57-144	0.61	0.75
Región 3	145-207	1.27	1.64
Región 4	208-291	1.25	1.57
Región 5	292-310	0.79	1.23
Región 6-Yap	311-403	0.73	1.11
Región 7	404-426	1.41	1.33

**Fig. I-7: Definición de regiones conservadas y potencialmente funcionales en FlbB.** En el gráfico se muestra el valor de la entropía de Shannon, que mide la complejidad o grado de información de un código, para cada una de las posiciones en el alineamiento múltiple de los homólogos de los grupos “FlbB + FlbE” y “sólo FlbB”. Un valor inferior a 1 de la entropía de Shannon indica que dicha posición tiene un número muy limitado de sustituciones en el alineamiento múltiple y por lo tanto está muy conservada o tiene un grado de información muy alto. La región más conservada es el bZIP (valores inferiores a 1 en “FlbB + FlbE” y “sólo FlbB”, ver tabla debajo del gráfico). Entre los homólogos de “FlbB + FlbE” se identifica al dominio YAP, la región 6, y a la región 5, también denominada C (marcada en la parte inferior con un cuadro rojo). Otros grupos de residuos con baja entropía de Shannon y además con predicción de estar altamente organizadas son las regiones A y B (cuadros rojos en la parte inferior). En las diferentes regiones definidas en este estudio se marcan las posiciones con residuos altamente conservados con el código de cuadros de colores que se indica en el diagrama de la izquierda. Con triángulos se marcan posiciones con estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice (triángulos azules) o lámina  $\beta$  (triángulos blancos).

## **6.- El factor VeA, la luz y su rol en el desarrollo de los hongos**

En los hongos, el gen velvet, *veA*, está involucrado en diversos procesos celulares entre los que se incluye el control del desarrollo asexual y sexual. En *Aspergillus*, se ha descrito que controla el desarrollo en respuesta a la luz. VeA activa el desarrollo sexual, mientras que inhibe el asexual y esta regulación tiene lugar de manera dependiente de la luz. En una cepa silvestre VeA de *Aspergillus nidulans*, la presencia de luz causa un doble efecto, por un lado la reducción y el retraso en la formación de cleistotecios mientras que promueve el desarrollo asexual. En oscuridad se produce el efecto inverso activándose el desarrollo de estructuras reproductivas sexuales y de sus células anejas (Bayram *et al.*, 2010; Calvo, 2008). Dada la complejidad de la señal de iluminación, diferentes estudios han demostrado que VeA integra tanto la señal de luz roja (Mooney and Yager, 1990), como la de luz azul (Purschwitz *et al.*, 2008; Yager *et al.*, 1998), siendo la luz blanca un estímulo mixto de las anteriores. Por otro lado, se han estudiado parcialmente las opsinas en diferentes hongos como posibles receptores de luz verde. No se ha observado una alteración en el fenotipo de los diferentes hongos tras la inactivación de dichos genes, aunque existen evidencias de una función de NOP-1 (opsina de *N. crassa*) en la regulación del desarrollo de *N. crassa* (Bieszke *et al.*, 1999).

La capacidad del hongo de regular el proceso de diferenciación asexual en dependencia de la luz se ve alterada en presencia del alelo *veA1* (Kafer, 1965). Este alelo mutante difiere del alelo silvestre en un nucleótido en el codón de iniciación, la sustitución G3T. Esta mutación cambia el codón de la metionina iniciadora por un codón codificante para isoleucina. La proteína VeA1 se inicia en la metionina correspondiente a la posición 37 de la proteína VeA silvestre. Esta mutación ha sido ampliamente utilizada por los laboratorios que han trabajado con *A. nidulans* puesto que permite la esporulación del hongo en el interior de los incubadores, obteniendo las conidiosporas que son principal fuente de inóculo y propagación del hongo. Por ello, este alelo mutante *veA1* “contamina” muchas cepas que se han empleado en estudios relacionados con el desarrollo de estructuras reproductivas (Kim *et al.*, 2002).

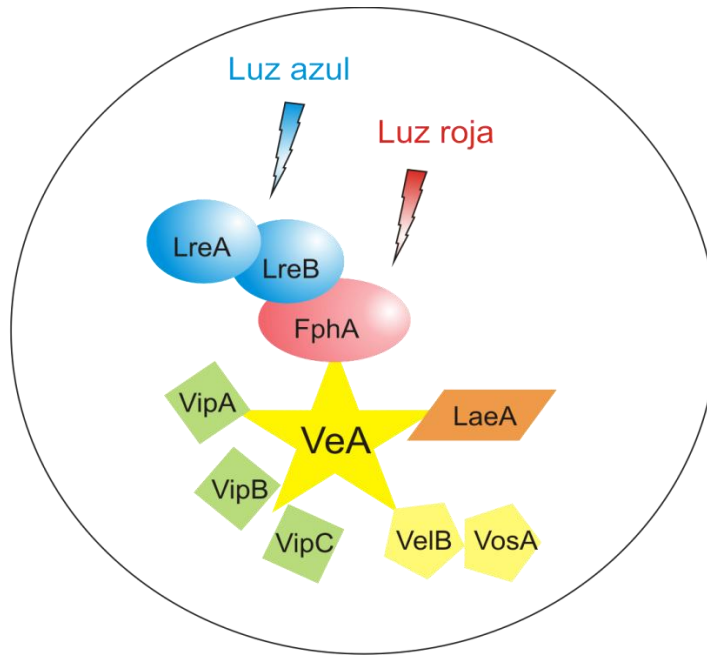
El papel regulador de VeA deriva de su localización celular y de su capacidad para formar complejos proteicos (Bayram *et al.*, 2010; Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009; Rodríguez-Romero *et al.*, 2010; Stinnett *et al.*, 2007). En cuanto a la localización, VeA se sitúa en los núcleos de las hifas vegetativas cuando se encuentra en oscuridad (Stinnett *et al.*, 2007). Sin embargo, en presencia de luz, se observa a velvet a lo largo de la hifa, y su transporte al núcleo mediado por la importina  $\alpha$  (Araújo-Bazán *et al.*, 2009) se ve impedido por la iluminación (Stinnett *et al.*, 2007). Los estudios realizados por Kim y colaboradores tras la generación de mutantes nulos y de sobreexpresión para VeA demostraron que  $\Delta veA$  no es capaz de producir estructuras sexuales incluso en condiciones que promueven la reproducción sexual. Se encontró el efecto contrario cuando *veA* se sobreexpresó, dando lugar al incremento de la formación de estructuras sexuales acompañada de una reducción en la conidiación, incluso en condiciones favorables a la reproducción asexual (p. ej. altas concentraciones de sales). Estos resultados confirmaron que *veA* regula positivamente el desarrollo sexual, inhibiendo al mismo tiempo la reproducción asexual. Esta regulación se lleva a cabo, probablemente, mediante interacciones específicas con diferentes proteínas reguladoras (Bayram *et al.*, 2010; Purschwitz *et al.*, 2008; Purschwitz *et al.*, 2009).

La actividad reguladora de velvet no se restringe al control del desarrollo asexual o sexual, también está involucrado en la biosíntesis de metabolitos secundarios, como las micotoxinas (Calvo *et al.*, 2004; Cary *et al.*, 2007; Duran *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2003). La esterigmatocistina (ST) y la aflatoxina B1 (AF) son dos de estas toxinas cuya producción está regulada por velvet. Ambas se encuentran en la misma ruta metabólica, en la que la esterigmatocistina es el penúltimo intermediario en la ruta AF para varios hongos. Sin embargo, en *A. nidulans*, la esterigmatocistina es el producto final. En este caso, *veA* es necesario para la expresión del factor de transcripción *aflR*, activador específico del *cluster* de la esterigmatocistina y que permite la síntesis de la misma (Lee *et al.*, 2006). De manera similar, VeA se requiere para la transcripción de *aflR* y también de un segundo regulador del *cluster* AF, *aflJ*, descritos en *A. parasiticus* y *A. flavus* (Du *et al.*, 2007; Meyers *et al.*, 1998). Por lo tanto, en los mutantes nulos de velvet, la biosíntesis de ST y AF está bloqueada. También se ha descubierto que *veA* es necesario para la

producción de penicilina en *A. nidulans* (Kato *et al.*, 2003). El hecho de que el mutante *veA1* carezca de los primeros 36 aminoácidos en *A. nidulans*, no impide la producción de penicilina o esterigmatocistina, aunque la producción de ST es menor en la cepas *veA1* que en las *veA+* (Stinnett *et al.*, 2007).

La proteína VeA de 573 aminoácidos, no es un factor transcripcional por lo que la regulación de los procesos descritos previamente debe ejercerla interaccionando con los otros elementos del denominado Complejo Velvet. Uno de los elementos fotosensibles con los que interacciona VeA es el receptor de luz roja tipo fitocromo FphA (Purschwitz *et al.*, 2008) y los receptores de luz azul LreA y LreB, ortólogos de los “White collar” de *N. crassa*, interaccionan con VeA a través de éste. FphA interacciona con LreB y es a éste último al que se une LreA. Así la percepción de luz roja y azul es mediada por el mismo complejo proteico en *A. nidulans*. Sin embargo, el grado de complejidad de esta asociación de proteínas en las que participa VeA es muy elevado dado que el control de ciertas rutas pertenecientes al metabolismo secundario ocurre mediante la interacción de Velvet con otros dos elementos LaeA y VelB (Bayram *et al.*, 2008; Bok and Keller, 2004). LaeA codifica para una metil transferasa de histonas y su delección causa la reducción en la producción de compuestos como la esterigmatocistina y la penicilina (Bok and Keller, 2004). VelB es una proteína similar a VeA con la que interacciona VosA, necesaria para la biogénesis de trehalosa en las esporas. Finalmente, aparecen en el complejo 3 proteínas descubiertas más recientemente por Kim y colaboradores denominadas VipA, VipB y VipC que estarían interaccionando directamente con VeA. VipA podría estar implicada en la señalización del fitocromo, VipB se identificó como una posible metil transferasa y VipC actúa como regulador negativo del desarrollo sexual en presencia de luz (Kim y colaboradores, poster en la XXIV Fungal Genetics Conference at Asilomar, sin publicar) (figura I-8).





**Fig. I-8: Modelo del complejo VeA.** El receptor de luz roja tipo fitocromo FphA interacciona con VeA. FphA interacciona con LreB, al que a su vez se une LreA. Tanto LreA como LreB son ortólogos de los receptores de luz azul tipo “White Collar” de *N. crassa*. Por otro lado, VeA interacciona con LaeA y ambos se requieren para la biosíntesis de diversos productos naturales. Otro de los interactores de VeA es VelB, otra proteína tipo velvet, a la cual se une VosA. Adicionalmente, se han descubierto recientemente otras 3 proteínas interactoras de VeA: VipA, VipB y VipC. Modificado a partir de Calvo et al, 2008.

## **7.- Señales que actúan como morfógenos fúngicos**

Existen multitud de señales que afectan al comportamiento y la morfología de la colonia fúngica. Éstas pueden dividirse entre señales abióticas y bióticas. Son ejemplos de señales abióticas la luz o la emergencia al aire, previamente descritas, como también lo son la adición externa de elevadas cantidades del anión fosfato o del catión calcio. Estos últimos causan una conidiación más profusa del hongo y por ello son elementos ampliamente manejados en nuestro laboratorio para la obtención de conidiosporas para su posterior utilización como inóculo. Entre las señales bióticas producidas por el propio hongo encontramos varios ejemplos, como el indicador de que un suelo ya ha sido previamente colonizado. Esta señal fue descrita hace casi 15 años, cuando se observó que el hongo no crecía sobre zonas de cultivos sólidos que habían sido previamente ocupadas por la misma o diferente cepa del mismo hongo, incluso tras haber suplementado el



medio con los nutrientes necesarios (Bottone *et al.*, 1998). Sin embargo, la identificación de este compuesto endógeno no se produjo hasta hace pocos años cuando en el laboratorio del Dr. Ugalde demostraron que en *Aspergillus nidulans* este agente presente en el medio se trataba del bicarbonato (Rodríguez-Urra *et al.*, 2009). El bicarbonato se origina a partir del CO<sub>2</sub> producido por la respiración del hongo que al reaccionar con el agua presente en el medio da lugar al ácido carbónico. La alcalinización del medio causado por el propio metabolismo celular provoca la disociación de este ácido, dando como producto el bicarbonato. Así, el bicarbonato muestra una acumulación dependiente del crecimiento radial de la colonia fúngica, formándose un gradiente que comienza con bajas concentraciones en las hifas periféricas, y alcanzando sus máximos valores en la zona central de la colonia.

Con interés especial para esta tesis, se explican en mayor detalle dos de estas señales bióticas: el factor de FluG y las oxilipinas.

### 7.1 El factor de FluG

El activador temprano de la conidiación FluG está involucrado en la producción de un metabolito, tal y como se ha descrito en el apartado 2.2 de esta misma introducción. Este metabolito puede difundirse desde una cepa silvestre a una cepa mutante *fluG*, causando la conidiación de esta última en las zonas de contacto. Además, la cepa  $\Delta fluG$  puede recuperar la conidiación en la zona de contacto al cultivarla junto a una cepa  $\Delta flbB$ , hecho que resultó clave en el aislamiento de los mutantes *flbB*<sup>-</sup> (Etxebeste *et al.*, 2008). Recientemente, se ha descubierto que este metabolito producido por FluG se trata en realidad, de la combinación de dos compuestos: el deshidroaustinol y el diorcinol (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012). Ambos forman un aducto el cual provoca la producción de esporas en cepas mutantes  $\Delta fluG$ , inicialmente aconidiales. El uso de uno solo de los compuestos no es suficiente para causar este efecto por sí mismo. Este hecho fue descubierto durante los bioensayos en los que se añadió un extracto proveniente del medio maduro en el que se había cultivado una cepa silvestre, sobre una cepa mutante de *fluG*. Dicho extracto fue purificado, siguiendo siempre la fracción activa capaz de revertir el fenotipo de *fluG*<sup>-</sup>, hasta llegar al aislamiento total de una sola sustancia, el

deshidroaustinol. Sin embargo, la administración del deshidroaustinol puro no causó la conidiación de la cepa *fluG*<sup>-</sup>, a diferencia de la fracción previa. Cuando se analizó la última fracción activa, se encontró que además del deshidroaustinol, estaba presente el diorcinol y que la conjunción de ambos era necesaria para producir el efecto de conidiación (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012).

## 7.2 Oxilipinas

Las oxilipinas de 8 carbonos son compuestos orgánicos volátiles, (VOC, por sus siglas en inglés) que produce el propio hongo y les concede su característico olor; sin embargo el interés para este trabajo se centra en su papel como autorreguladores del desarrollo. Este grupo de moléculas proviene de la oxidación y degradación de ácidos grasos como el oleico, el linoléico y el linolénico mediante la actividad de las enzimas denominadas lipooxigenasas. Entre las oxilipinas se encuentran los factores *psi* (**p**recocious **s**exual **i**nducer) que regulan el balance entre el desarrollo sexual y asexual en *A. nidulans*, así como la producción de micotoxinas (Tsitsigiannis and Keller, 2007).

En este trabajo se han analizado el 1-octen-3-ol, la 3-octanona y el 3-octanol, compuestos volátiles de 8 carbonos incluidos en el grupo de las oxilipinas, que han demostrado estar involucrados en los procesos de germinación y crecimiento, así como en la conidiación. En *Agaricus bisporus* la 3-octanona es el principal VOC de 8 carbonos que se acumula en el interior del basidiocarpo (Combet *et al.*, 2009). En el hongo *Penicillium paneum*, el 1-octen-3-ol es un compuesto almacenado en el interior de las conidiosporas que se libera tras la germinación de éstas para garantizar la efectiva colonización del suelo en cultivos superpoblados. Así, esta oxilipina actuaría como un autoinhibidor y evitaría la presencia de un excesivo número de células fúngicas respecto a los posibles nutrientes contenidos en el medio (Chitarra *et al.*, 2004). Estudios recientes también han mostrado que el 1-octen-3-ol, se produce en cultivos esporulantes de *Trichoderma*, junto con otras oxilipinas de 8 carbonos como la 3-octanona o el 3-octanol. Resulta interesante que estas oxilipinas sean capaces de promover la conidiación en cultivos adyacentes no esporulantes (Nemcovic *et al.*, 2008). En cuanto el efecto de estos compuestos en la capacidad de germinación y conidiación en *Aspergillus nidulans* existía

una evidencia muy preliminar de su papel en el crecimiento del hongo en el trabajo realizado por (Trinci and Whittaker, 1968) y fue posteriormente estudiado en más detalle por el grupo del Dr. Ugalde.

Tomando como base los estudios de Chitarra y colaboradores, en el laboratorio se investigó la influencia del agente 1-octen-3-ol como inhibidor de la germinación y del crecimiento radial en *Aspergillus nidulans*. Los datos obtenidos por la Dra. Shandra Cordobés y recogidos en su tesis doctoral (Cordobés, 2005) demuestran que altas concentraciones de esporas causan la inhibición del proceso de germinación y del crecimiento radial. En el interior de las conidiosporas se almacenan principalmente tres VOCs, 3-octanona, 3-octanol, y en mayor cantidad el 1-octen-3-ol. Se presumía que este compuesto debía de ser el agente responsable de este efecto autoinhibitorio del desarrollo, incluyendo germinación y mantenimiento del crecimiento celular polarizado. En esta tesis se profundiza en el efecto autorregulador de los tres compuestos VOC de 8 carbonos identificados.

## **OBJETIVOS**



Esta tesis doctoral se enfoca al estudio molecular, bioquímico y celular de uno de los factores transcripcionales necesarios para activar la ruta central de la conidiación de *Aspergillus nidulans*, el factor bZIP FlbB. La particular distribución celular de FlbB debe precisar de mecanismos moleculares específicos que además pueden estar involucrados en su actividad transcripcional. Tras haber realizado diferentes estudios para definir la existencia del Complejo Apical, demostrar la capacidad de unión a DNA de FlbB y la regulación coordinada junto con FlbD de la activación del gen maestro de la conidiación *brlA*, nos planteamos los siguientes objetivos principales para profundizar en la comprensión de los mecanismos que median en el desarrollo de las estructuras de reproducción asexual en *Aspergillus nidulans*.

**1.- Realizar un análisis funcional de FlbB:**

a) Determinar las regiones responsables de la interacción con otros componentes de la ruta de señalización UDA, como el propio FlbB, el factor transcripcional c-Myb FlbD y la proteína FlbE.

b) Establecer el mecanismo molecular y celular de la formación del complejo apical.

**2.- Estudio del papel regulador de FlbB sobre otras rutas del metabolismo primario o secundario.**

**3.- Factores ambientales que, de forma dependiente o autónoma a FlbB, regulan la capacidad de conidiación de *Aspergillus nidulans*.**



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1.- Cepas, oligonucleótidos y plásmidos utilizados

### 1.1 Cepas de *Aspergillus nidulans*

Tabla M&M-1: Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas durante la realización de esta tesis.

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD1425	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Nayak <i>et al.</i> , 2006)
BD167	<i>pyrG89; argB2; flbB::gfp/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD186	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbE::gfp/pyrG<sup>Af</sup></i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD185	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD143	<i>pyrG89; argB2; ΔflbB::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD142	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::pyrG<sup>Af</sup></i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD177	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD178	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB<sup>Af</sup>, riboB2</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD187	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbE::gfp/pyrG<sup>Af</sup>, riboB2</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2009)
BD295	<i>pyrG89; argB2; flbB::3xHA/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4316	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB 1-426/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4317	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB 1-361/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4318	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB 1-341/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4319	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB 1-321/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4320	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB 1-294/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4314	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[flbB<sup>p</sup>::gfp::flbB 1-426]<sub>3x</sub>::pyroA<sup>*</sup> <sup>(a)</sup>, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4315	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[flbB<sup>p</sup>::gfp::flbB 1-361]<sub>3x</sub>::pyroA<sup>*</sup>, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, O. Etxebeste
BD11	<i>biA1; flbB102; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)
BD14	<i>biA1; flbB100; veA1</i>	(Etxebeste <i>et al.</i> , 2008)

Cepa	Genotipo	Fuente
BD381	<i>pyrG89; argB2; flbB<sup>M11</sup>::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, A. Garzia
BD382	<i>pyrG89; argB2; flbB::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, A. Garzia
MAD2666	<i>argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	(Markina-Inarrairaegui, 2011)
BD589	<i>pyrG89; argB2; flbB<sup>T200A;T201A</sup>::gfp/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
BD591	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>T200A;T201A</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
BD409	<i>pyrG89; argB2; flbB<sup>L104A;E105A</sup>::gfp/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
BD461	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>L104A;E105A</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
BD467	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>C382A</sup>, ΔnkuA::argB; pyroA4; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
BD470	<i>pyrG89; argB2; gfp::flbB<sup>C397A</sup>, ΔnkuA::argB, pyroA4; veA1</i>	Este estudio, O. Etxebeste
MAD4332	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[alcA<sup>P</sup>::flbB::gfp]:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2010)
MAD4321	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>1x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4322	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>2x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4323	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>3x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4324	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>&gt;3x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4325	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>1x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB<sup>Af</sup>, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4326	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>3x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB<sup>Af</sup>, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4327	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB]<sub>&gt;3x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, ΔflbE::riboB<sup>Af</sup>, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4328	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB<sup>C382A</sup>]<sub>1x</sub>:pyroA*, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García

Cepa	Genotipo	Fuente
MAD4329	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup> pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB<sup>C382A</sup>]<sub>2x</sub>::pyroA<sup>*</sup>, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4330	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB<sup>C382A</sup>]<sub>3x</sub>::pyroA<sup>*</sup>, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
MAD4331	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA<sup>+</sup>::[gpdA<sup>P</sup>::gfp::flbB<sup>C382A</sup>]<sub>&gt;3x</sub>::pyroA<sup>*</sup>, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2</i>	Este estudio, E. Herrero-García
BD375	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, flbD::3xHA/pyrG<sup>Af</sup></i>	Este estudio, A. Garzia
MAD4333	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; flbB::gfp/pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; veA1, riboB2, ΔflbD::riboB<sup>Af</sup></i>	(Garzia et al., 2010)
BD438	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gmcA::gfp/pyrG<sup>Af</sup>; veA1</i>	Este estudio, (Etxebeste et al., 2012)
BD440	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; gmcA::3xHA/pyrG<sup>Af</sup>; veA1</i>	Este estudio, (Etxebeste et al., 2012)
BD429	<i>pyrG89; argB2; pyroA4; ΔnkuA::argB; ΔgmcA::pyrG<sup>Af</sup>; veA1</i>	Este estudio, (Etxebeste et al., 2012)
BD442	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; gmcA::gfp/pyrG<sup>Af</sup>; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Etxebeste et al., 2012)
BD444	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; gmcA::3xHA/pyrG<sup>Af</sup>; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Etxebeste et al., 2012)
BD431	<i>pyrG89, pabaA1; argB2; ΔflbB::riboB<sup>Af</sup>, pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔgmcA::pyrG<sup>Af</sup>; veA1, riboB2</i>	Este estudio, (Etxebeste et al., 2012)
RNKT5.1	<i>pyroA4; veA+</i>	(Stinnett et al., 2007)
FGSC33	<i>biA1; pyroA4; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
BD215	<i>pyrG89; ΔflbB::pyrG<sup>Af</sup>, pyroA4; veA+</i>	Este estudio, (Herrero-García et al., 2011)
BD165	<i>pyrG89, pabaA1, yA2; argB2; ΔflbB::pyrG<sup>Af</sup></i>	O. Etxebeste, sin publicar
WIM126	<i>pabaA1, yA1; veA+</i>	(Butnick et al., 1984)
FGSC26	<i>biA1; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
TTA127.4	<i>biA1; ΔfluG::trpC; veA1</i>	(Lee and Adams, 1994b)
RRMD3.4	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	(Stinnett et al., 2007)
MAD2446	<i>pyrG89; wA4; inoB2, pyroA+::[hhoA::mCh]::pyroA<sup>*</sup>; (Myc)<sub>3x</sub>::PacC(PacC900); veA1</i>	(Etxebeste et al., 2009)
BD234	<i>ΔfluG::trpC; pyroA4; veA+</i>	Este estudio, (Herrero-García et al., 2011)
BD237	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔflbC::pyrG<sup>Af</sup>; veA1</i>	(Kwon et al., 2010a)

Cepa	Genotipo	Fuente
BD239	<i>pyroA4, ΔnkuA::argB; ΔflbC::pyrG<sup>Af</sup>; veA+</i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2011)
BD197	<i>pyrG89; argB2; pyroA4, ΔnkuA::argB, veA1, ΔflbD::pyrG<sup>Af</sup></i>	(Garzia <i>et al.</i> , 2010)
BD276	<i>pyrG89; pyroA4; veA+, ΔflbD::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2011)
BD508	<i>pyrG89?; argB2?; pyroA4, ΔnkuA::argB?; veA+, ΔflbE::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este estudio
BD400	<i>pyrG89; pyroA4; veA+, ΔbrlA::pyrG<sup>Af</sup></i>	Este estudio, (Herrero-Garcia <i>et al.</i> , 2011)

(<sup>o</sup>) (mutación *pyroA4*+truncamiento)

## 1.2 Oligonucleótidos

Tabla M&M-2: Lista de oligonucleótidos utilizados durante la realización de esta tesis.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
FlbB-GSP1	CCTCTTGTGGATGCACTCTGGAATGTGGGC	Generación de flbB-3xHA (y flbB-GFP)
FlbB-GSP2	TGAATACATCGTCTCATCAGCATGCCGGGT	Generación de flbB-3xHA (y flbB-GFP)
FlbB-GSP3	TGACCTGACAGCTCGCTTTTTTCTGAGCTTTCTA ATGC	Generación de flbB-3xHA (y flbB-GFP)
FlbB-GSP4	GAAAGGTGCGTGGGTTCGAATCCCACC	Generación de flbB-3xHA (y flbB-GFP y GFP-flbB)
FlbB-GFP1	(TCCCGGCATGCTGATGAGACGATGTATTCA) + GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Generación de flbB-3xHA (y flbB-GFP)
FlbB-GFP2	(GCATTAGAAAGCTCAGAAAAAAGCGAGCTGT CAGGTCA) + GTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG	Generación de flbB-3xHA (y flbB-GFP)
GST-flbE 1	CGGAATTCCCATGCCAGTCTACATGCTC	Construcción pGEX-FlbE
GST-flbE 2	CGGAATTCCGTACAGCAATCACGAAAACG	Construcción pGEX-FlbE
GST-FlbB 1	CGGGATCCATGACTTCGATCAGTAGTAGGC	Construcción pGEX-FlbB 1-426
GST-FlbB 2	CGGAATTCCTGTGTCAGGTCATGAATACATCG	Construcción pGEX-FlbB 1-426
FlbB bZIP +1	CGGGATCCAAACGAAGAGGACCAAAACCCGATAGC	Construcción pGEX-FlbB bZIP
FlbB bZIP -1	CGGAATTCCTCAGTTTTCTCCGATATGGAGTTGGCC	Construcción pGEX-FlbB bZIP
FlbB Aa361	CGGAATTCATACATCTCATGGTTCTTTAGAGCC	Construcción pGEX-FlbB 67-361
FlbB Aa 313rev	GCGAATTCACGTAGTATTGGCGATGTAGC	Construcción pGEX-FlbB 67-313

Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
FlbB Aa 290rev	GCGAATTCATCATCATCGGCTTCAGTG	Construcción pGEX-FlbB 1-290
FlbB Aa 232rev	CGGAATTCAGCAATACCCTGATTGTTTCGG	Construcción pGEX-FlbB 67-232
FlbB Aa 169rev	CGGAATTCGGATCCCATCTGTCGCTCG	Construcción pGEX-FlbB 67-169
FlbB Aa115	GCGGATCCTACACTCAGGAGATATCTG	Construcción pGEX-FlbB 115-426
flbB_dim(+1)	GCAATACATCAGAGCG <b>G</b> CAGCAAGCGAAGTTGC GCGG	Mutación en la región de dimerización de FlbB
flbB_dim(-1)	CCGCGCAACTTCGCT <b>TGCTG</b> CCGCTCTGATGTAT TGC	Mutación en la región de dimerización de FlbB
flbB_motiA(+1)	GCACGCCGCCAG <b>G</b> CAGCAGTGTATCAGGAATGA GC	Mutación en la región A de FlbB
flbB_motiA(-1)	GCTCATTCTGATGACACT <b>TGCTG</b> CTGGCGGCGTG C	Mutación en la región A de FlbB
flbBmutag+1	GGGGTACCGCGCACGGTTCAGGTTTACC	Generación del plásmido pBSK-GFP-FlbB
flbBmutag-1	CGTGATGCCGAAATCATACCC	Generación del plásmido pBSK-GFP-FlbB
<i>flbB</i> <sub>361Ystop(+1)</sub>	GCCGATGATGAGGACATGCCA <b>T</b> AATCAGGG	Truncamiento 361 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>361Ystop(-1)</sub>	CCCTG <b>A</b> TATGGCATGTCCTCATCATCGGC	Truncamiento 361 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>341Vstop(+1)</sub>	CCGCACT <b>A</b> GACCTACGACCTGCCGCAT	Truncamiento 341 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>341Vstop(-1)</sub>	GCATGCGGCAGGTCGTAGGT <b>C</b> TAGTGCGG	Truncamiento 341 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>321Kstop(+1)</sub>	CGACA <b>A</b> CTATGA <b>A</b> CTGAGGGACAGGTTACCCCG	Truncamiento 321 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>321Kstop(-1)</sub>	CGGGGTAACCTGTCCCTCAGT <b>T</b> CATAGTTGTCG	Truncamiento 321 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>294Fstop(+1)</sub>	CCATGAGATG <b>TAA</b> ACGAAGTTGACGCGGGACG	Truncamiento 294 de FlbB
<i>flbB</i> <sub>294Fstop(-1)</sub>	CGTCCCGCGTCA <b>A</b> CTTCGTT <b>A</b> CATCTCATGG	Truncamiento 294 de FlbB
flbB* M1I forw	GATCGAAGTAATGGTGGTTCGAGC	Sustitución M1I de FlbB
flbB* M1I rev	GCTCGACCACCATTACTTCGATC	Sustitución M1I de FlbB
flbB_SC382(+1)	GAGAACAAGGTGCGC <b>G</b> CATACGGATTCGGG	Mutación de la cisteína C382A de FlbB
flbB_SC382(-1)	CCCGAATCCGTAT <b>TG</b> CGCGCACCTTGTCTC	Mutación de la cisteína C382A de FlbB
flbB_SC397(+1)	CTTTGA <b>A</b> CTCATGGAC <b>G</b> CATTTAGCAGCGTCCTG GGG	Mutación de la cisteína C397A de FlbB
flbB_SC397(-1)	CCCCAGGACGCTGCTAA <b>A</b> T <b>TG</b> CGTCCATGAGTTCA AAG	Mutación de la cisteína C397A de FlbB
flbD-GSP1	GGTGAATGGCAACATGAAC	Generación de flbD-3xHA (y flbB-GFP)
flbD-GSP2	GTT CAA GAG GTT GTC GAG GC	Generación de flbD-3xHA (y flbB-GFP)
flbD-GSP3	TGAACGATCACACGACTCTCTT	Generación de flbD-3xHA (y flbB-GFP)
flbD-GSP4	GGCAGGCGTTACTGTATACGT	Generación de flbD-3xHA (y flbB-GFP)

Nombre	Secuencia (5'-3')	Objetivo
flbD-GFP1	GCCTCGACAACCTCTTGAACGGAGCTGGTGCAG GCGCTGGAGCC	Generación de flbD-3xHA (y flbB-GFP)
flbD-GFP2	AAGAGAGTCGTGTGATCGTTAGTCTGAGAGGA GGCACTGATGCG	Generación de flbD-3xHA (y flbB-GFP)
gmcA-PP1	CCTCGTGCATTCAACAACCTAAGGGGG	Construcción de $\Delta$ gmcA
gmcA-PP2	TTTTGCAGTGATTTAGTGCAGGACGG	Construcción de $\Delta$ gmcA
gmcA-SMP1	CCGTCCTCGCACTGAAATCACTGCAAAAACCGGT CGCCTCAAACAATGCTCT	Construcción de $\Delta$ gmcA
gmcA-GFP1	GCGCGGACTTTATCAAGGAGGAGTGG GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC	Construcción gmcA-GFP y gmcA-3xHA
gmcA-GFP2	CCACTTTTGCAGTCCAGGTCTCGGCCTAGTCTG AGAGGAGGCACTGATGCG	Construcción de $\Delta$ gmcA, gmcA-GFP y gmcA-3xHA
gmcA-GSP1	CTTTTGGCTTTCGTCATCCCCGC	Construcción gmcA-GFP y gmcA-3xHA
gmcA-GSP2	CCACTCCTCCTTGATAAAGTCCGCGC	Construcción gmcA-GFP y gmcA-3xHA
gmcA-GSP3	TAGGCCGAGACCTGGAGTCGCAAAAGTGG	Construcción de $\Delta$ gmcA, gmcA-GFP y gmcA-3xHA
gmcA-GSP4	GCTTCACCATCACGACAGTAACACACCG	Construcción de $\Delta$ gmcA, gmcA-GFP y gmcA-3xHA

### 1.3 Plásmidos

#### 1.3.1 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas *in vitro* y en *E. coli*

- **pGEX-2T:** Plásmido comercial de la casa Pharmacia. Permite generar fusiones de la proteína Glutathion S-Transferasa (GST) a la parte amino terminal de cualquier proteína. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST.
- **pGEX-FlbE:** Para construirlo se amplificó por PCR el cDNA completo de *flbE* a partir del plásmido pGEM-T-Easy-FlbE cDNA *alcA* (A. Garzia) utilizando los oligonucleótidos GST-FlbE 1 y GST-FlbE 2 (ver tabla M&M-2) en los que se incluyeron dianas de restricción para la enzima *EcoRI* en los extremos 5' y 3'. El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbE.
- **pGEX-FlbB 1-426:** Se amplificó por PCR el cDNA completo de *flbB* a partir del plásmido pGEM-T-Easy-FlbB cDNA *alcA* (A. Garzia) utilizando los oligonucleótidos

GST-FlbB 1 y GST-FlbB 2 (ver tabla M&M-2) en los que se añadieron dianas de restricción para la enzima *Bam*HI y *Eco*RI en el extremo 5' y 3', respectivamente. El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 1-426.

- **pGEX-FlbB 1-426 [T200A; T201A]:** Para construirlo se utilizó como base el plásmido pGEX-FlbB 1-426 en el que se introdujo la doble sustitución en los residuos citados, mediante PCR gracias a los oligonucleótidos flbB\_motiA(+1) y flbB\_motiA(-1) (ver tabla M&M-2). Para seleccionar el plásmido de interés se siguió el protocolo descrito en el apartado de mutagénesis dirigida (ver sección 4.6 de M&M) Tras ser comprobado por secuenciación, este plásmido se usó para la expresión de la proteína GST-FlbB<sup>T200A;T201A</sup>. Esta proteína lleva una doble mutación en la región definida como región A de FlbB, que pudiera estar implicada en la interacción con FlbE.
- **pGEX-FlbB 67-426:** Partiendo del plásmido pGEX-FlbB 1-426 como molde, se amplificó el cDNA de *flbB* desde el triplete que codifica para el aminoácido 67 hasta el 426, utilizando los oligonucleótidos FlbB bZIP +1, incluyendo diana de restricción para *Bam*HI y el previamente descrito GST-FlbB 2 que lleva la diana para *Eco*RI (ver tabla M&M-2). El fragmento purificado y digerido con las anteriores enzimas se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 67-426. Esta proteína de fusión carece de los primeros 66 aminoácidos de FlbB, pobremente conservados en los homólogos de éste, limitando el extremo N- terminal de la proteína al comienzo del dominio de unión a DNA bZIP.
- **pGEX-FlbB 67-361:** A partir del plásmido pGEX-FlbB 67-426 que fue el que actuó como molde en los siguiente truncamientos de FlbB, se amplificó el cDNA de *flbB* desde el triplete que codifica para el aminoácido 67 hasta el 361, utilizando los oligonucleótidos FlbB bZIP +1 y el nuevo FlbB Aa361 incluyendo la diana de *Eco*RI



(ver tabla M&M-2). El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 67-361. Esta proteína limitada por el dominio bZIP por el extremo N-terminal, carece de la región conservada de FlbB más cercana al extremo C-terminal, denominada región E.

- **pGEX-FlbB 67-313:** Partiendo del plásmido pGEX-FlbB 67-426, se amplificó el cDNA de *flbB* desde el triplete que codifica para el aminoácido 67 hasta el 313, utilizando los oligonucleótidos FlbB bZIP +1 y el nuevo FlbB Aa313rev, incluyendo la diana de *EcoRI* (ver tabla M&M-2). El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 67-313. Esta proteína limitada por el dominio bZIP por el extremo N-terminal, carece de las regiones conservadas D y E de FlbB.
- **pGEX-FlbB 1-290:** En este caso, a pesar del intento de construcción del plásmido 67-290 para ser consistente con los demás vectores, éste no pudo expresarse correctamente en *E. coli*, por lo que se cambió el diseño para la creación de este plásmido. Se construyó a partir del pGEX-FlbB 1-426 gracias a los oligonucleótidos GST-FlbB 1 y FlbB Aa290rev, incluyendo en este último la diana de restricción para *EcoRI* (ver tabla M&M-2) y se introdujo en el plásmido pGEX-2T para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 1-290. Esta proteína que parte desde el principio de la proteína no posee las regiones conservadas C, D y E de FlbB.
- **pGEX-FlbB 67-232:** Partiendo del plásmido pGEX-FlbB 67-426, se amplificó el cDNA de *flbB* desde el triplete que codifica para el aminoácido 67 hasta el 232, utilizando los oligonucleótidos FlbB bZIP +1 y el nuevo FlbB Aa232rev, incluyendo la diana de *EcoRI* (ver tabla M&M-2). El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 67-232. Esta proteína limitada por el dominio bZIP por el extremo N-terminal, carece de las regiones conservadas B, C, D y E de FlbB.

- **pGEX-FlbB 67-169:** A partir del plásmido pGEX-FlbB 67-426, se amplificó el cDNA de *flbB* desde el triplete que codifica para el aminoácido 67 hasta el 169, utilizando los oligonucleótidos FlbB bZIP +1 y el nuevo FlbB Aa169rev, incluyendo la diana de *EcoRI* (ver tabla M&M-2). El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 67-169. Esta proteína limitada por el dominio bZIP por el extremo N-terminal, carece de las regiones conservadas A, B, C, D y E de FlbB.
- **pGEX-FlbB 67-140:** Este plásmido construido con anterioridad por el Dr. Etxebeste, se describe en (Etxebeste *et al.*, 2008) y comprende exclusivamente el dominio de unión a DNA tipo bZIP de FlbB.
- **pGEX-FlbB 115-426:** Partiendo del plásmido pGEX-FlbB 1-426 como molde, se amplificó el cDNA de *flbB* desde el triplete que codifica para el aminoácido 115 hasta el 426, utilizando los oligonucleótidos FlbB Aa115, incluyendo diana de restricción para *BamHI* y el previamente descrito GST-FlbB 2 que lleva la diana para *EcoRI* (ver tabla M&M-2). El fragmento purificado se introdujo en pGEX-2T y se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína GST-FlbB 115-426. Esta proteína incluye todas las regiones descritas para FlbB (A, B, C, D y E) a excepción del dominio de unión a DNA bZIP.
- **pGEX-FlbB 1-426 [L104A; E105A]:** Para construirlo se utilizó como base el plásmido pGEX-FlbB 1-426 en el que se introdujo la doble sustitución en los residuos citados, mediante PCR gracias a los oligonucleótidos *flbB*\_dim(+1) y *flbB*\_dim(-1) (ver tabla M&M-2). Para seleccionar el plásmido de interés se siguió el protocolo descrito en el apartado de mutagénesis dirigida (ver sección 4.6 de M&M). Tras ser comprobado por secuenciación, este plásmido se usó para la expresión de la proteína GST-FlbB<sup>L104A;E105A</sup>. Esta proteína lleva una doble mutación en la región definida como posible región de dimerización de FlbB.

### 1.3.2 Plásmidos utilizados en *Aspergillus nidulans*

- **pBSK-pyroA:** Plásmido generado a partir del comercial pBlueSkript II en el que se ha introducido la secuencia que codifica para el gen *pyroA* de *A. nidulans* (O. Etxebeste).
- **pBSK-GFP-FlbB 1-426-pyroA:** Para construir este vector, se amplificó el fragmento que codifica para la fusión GFP-FlbB 1-426, incluyendo el promotor (1489bp) y el terminador (1615bp) de *flbB* proveniente del DNA genómico de la cepa BD185, con los oligonucleótidos flbBmutag +1 y flbBmutag -1 en los que se introdujo un sitio de restricción para *Asp718* en cada extremo (ver tabla M&M-2). Estas dianas fueron utilizadas para introducir este fragmento en la diana *Asp718* del plásmido pBSK-pyroA y la correcta orientación de inserción se determinó mediante digestión con *Pst*I. Se consideró orientación correcta la misma que la de *pyroA*. Este plásmido sirvió como base para los siguientes vectores truncados.
- **pBSK-GFP-FlbB 1-426 [T200A; T201A]-pyroA:** Este plásmido se construyó a partir del pBSK-GFP-FlbB 1-426, en el que se introdujo la doble sustitución en los residuos citados, mediante PCR gracias a los oligonucleótidos flbB\_motiA(+1) y flbB\_motiA(-1) (ver tabla M&M-2). Para seleccionar el plásmido de interés se siguió el protocolo descrito en el apartado de mutagénesis dirigida (ver sección 4.6 de M&M). Tras ser comprobado por secuenciación, se amplificó a partir de este plásmido el fragmento GFP-FlbB 1-426 [T200A; T201A] que fue utilizado para transformar la cepa nula de *flbB* (BD143).
- **pBSK-GFP-FlbB 1-426 [L104A; E105A]-pyroA:** Este plásmido se construyó a partir del pBSK-GFP-FlbB 1-426, en el que se introdujo la doble sustitución en los residuos citados, mediante PCR gracias a los oligonucleótidos flbB\_dim(+1) y flbB\_dim(-1) (ver tabla M&M-2). Para seleccionar el plásmido de interés se siguió el protocolo descrito en el apartado de mutagénesis dirigida (ver sección 4.6 de M&M). Tras ser comprobado por secuenciación, se amplificó a partir de este

plásmido el fragmento GFP-FlbB 1-426 [L104A; E105A] que fue utilizado para transformar la cepa nula de *flbB* (BD143).

- ***pBSK-GFP-FlbB 1-361-pyroA***: Este plásmido se construyó a partir del pBSK-GFP-FlbB 1-426, utilizando los oligonucleótidos flbB<sub>361Ystop(+1)</sub> y flbB<sub>361Ystop(-1)</sub> (ver tabla M&M-2) para introducir el codón stop en el residuo deseado, mediante PCR. El producto de PCR fue digerido con *DpnI* siguiendo el protocolo de mutagénesis dirigida (ver sección 4.6 de M&M), eliminando el DNA metilado y hemimetilado, siendo únicamente posible la transformación de *E. coli* con el plásmido recién creado. Finalmente, la secuencia fue verificada por secuenciación.
- ***pBSK-GFP-FlbB 1-341-pyroA***: Este plásmido se construyó a partir del pBSK-GFP-FlbB 1-426, utilizando los oligonucleótidos flbB<sub>341Vstop(+1)</sub> y flbB<sub>341Vstop(-1)</sub> (ver tabla M&M-2) para introducir el codón stop en el residuo deseado, mediante PCR. El producto de PCR fue digerido con *DpnI* para la selección del vector portador de la mutación de acuerdo con el protocolo de mutagénesis dirigida (ver sección 4.6 de M&M). Finalmente, la secuencia fue verificada por secuenciación.
- ***pBSK-GFP-FlbB 1-321-pyroA***: Este plásmido se construyó a partir del pBSK-GFP-FlbB 1-426, utilizando los oligonucleótidos flbB<sub>321Kstop(+1)</sub> y flbB<sub>321Kstop(-1)</sub> (ver tabla M&M-2) para introducir el codón stop en el residuo deseado, mediante PCR. El producto de PCR fue digerido con *DpnI* para la selección del vector portador de la mutación (ver sección 4.6 de M&M) y la secuencia fue verificada por secuenciación.
- ***pBSK-GFP-FlbB 1-294-pyroA***: Este plásmido se construyó a partir del pBSK-GFP-FlbB 1-426, utilizando los oligonucleótidos flbB<sub>294Fstop(+1)</sub> y flbB<sub>294Fstop(-1)</sub> (ver tabla M&M-2) para introducir el codón stop en el residuo deseado, mediante PCR. El producto de PCR fue digerido con *DpnI* para la selección del vector portador de la

mutación (ver sección 4.6 de M&M) y la secuencia fue verificada por secuenciación.

- ***palcA-FlbB 1-426 -GFP -pyroA***: Este plásmido se construyó a partir del DNA genómico de la cepa BD167, de la cual se amplificó la secuencia que codifica para FlbB 1-426 -GFP y se insertó en el vector *palcA-pyroA* descrito en (Garzia *et al.*, 2010) con las enzimas *Bam*HI/*Eco*RI (A.Garzia).
- ***pgpdA-GFP-FlbB 1-426-pyroA***: En esta construcción, se utilizó como plásmido receptor el *pgpdA-pyroA*\* denominado *pgpd003* en (Pantazopoulou and Peñalva, 2009) disponible en el laboratorio, que permite expresar de forma constitutiva y a niveles poco elevados quimeras utilizando para ello una forma truncada del promotor de la gliceraldehido 3-P deshidrogenasa, *gpdA<sup>mini</sup>*. En primer lugar, en el vector *pGEX-FlbB 1-426* digerido con *Bam*HI se introdujo un fragmento *Bam*HI-*Bam*HI que codifica para el epítipo GFP procedente del plásmido *p1155 (palcA<sup>P</sup>::GFP::PacC(5-250))*, (Mingot *et al.*, 2001). Así se puede producir la fusión de GFP al extremo N-terminal de FlbB. Una vez comprobada la correcta orientación del inserto, se liberó el fragmento que codifica GFP-FlbB 1-426 mediante las enzimas *Nco*I/*Eco*RI y tras su purificación, se introdujo en el vector *pgpdA-pyroA* digerido con las mismas enzimas. La diana *Nco*I contiene el triplete que codifica para la metionina iniciadora de la quimera y cuya expresión será ahora dirigida por el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*.
- ***pgpdA-GFP-FlbB 1-426 [C382A]-pyroA***: Para construir este plásmido se utilizó como molde el vector anterior, en el que se introdujo la mutación en la cisteína 382 a alanina, mediante los oligonucleótidos *flbB\_SC382(+1)* y *flbB\_SC382(-1)* (ver tabla M&M-2) por PCR. Para seleccionar el plásmido portador de la mutación en sus dos hebras, se siguió el protocolo descrito en el apartado 4.6 de M&M. Tras ser comprobado por secuenciación, este plásmido se usó para la expresión

constitutiva en *A. nidulans* de la proteína GFP-FlbB<sup>C382A</sup>. Esta proteína lleva una mutación en una cisteína del extremo C-terminal de FlbB.

## **2.- Condiciones y medios de cultivo para *Aspergillus nidulans***

La composición de las soluciones y los suplementos empleados en los medios para *Aspergillus nidulans* se describen a continuación siguiendo las indicaciones descritas en (Cove, 1966). Los cultivos se incubaron preferentemente a 37°C, aunque también se incubaron a 25°C (temperatura ambiente) o 30°C. Para los cultivos en medio líquido se utilizaron matraces cónicos de diferentes capacidades, y se utilizaron incubadores orbitales con una agitación de 250 rpm y con temperaturas ajustadas a 37°C o 30°C. Para microscopía se utilizó medio mínimo líquido específico (WMM) (Peñalva, 2005) en condiciones de cultivo estáticas a la temperatura de 25°C.

### **2.1 Medio mínimo de *Aspergillus* (MMA)**

Para cada litro de medio se diluyeron 20ml de solución de sales (ver más adelante) y se ajustó el pH a 6.5 con NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Para el medio mínimo sólido se añadió 1% (p/v) agar Oxoid. Después de la esterilización, y antes de ser repartido en las placas de *Petri*, se añadieron los suplementos necesarios para cada estirpe así como la fuente principal de carbono, normalmente D-glucosa al 1% (p/v), y la fuente de nitrógeno, tartrato de amonio a una concentración final de 5mM.

### **2.2 Medio completo de *Aspergillus* (MCA)**

La composición del medio para un litro es de:

- 20 ml de solución de sales (50x)
- 10 ml de solución de casaminoácidos (100x)
- 10 g de D-glucosa
- 2 g de bactopectona
- 1 g de extracto de levadura

Se añadió agua hasta un volumen de un litro y se ajustó el pH a 6.5 utilizando para ello una solución concentrada de hidróxido sódico (NaOH 10M). Para el medio sólido se añadió 1% (p/v) de agar Oxoid. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Antes de su utilización se añadió la fuente principal de nitrógeno, generalmente tartrato de amonio a una concentración final de 5mM, y 10ml/l de solución de vitaminas, al que también se añadieron los requerimientos específicos de cada estirpe en el caso de que no estuvieran ya incluidos en la solución de vitaminas.

### **2.3 Medio mínimo de regeneración base (MMR) y de cobertura (MMR-TOP)**

La composición del medio para un litro de MMR es de:

- 20ml de solución de sales (50x)
- 342g sacarosa (1M)

Se añadió agua hasta completar un litro de volumen y se ajustó el pH a 7. Antes de esterilizar el medio en el autoclave se añadió 1% (p/v) de agar Oxoid. En el momento de ser utilizado se añadieron las fuentes principales de carbono y nitrógeno, 1% (p/v) de D-glucosa y 5mM tartrato de amonio respectivamente, y los suplementos nutricionales necesarios para el crecimiento de las diferentes cepas. El procedimiento para la preparación del MMR-TOP es el mismo, únicamente cambia la concentración de agar que en este caso es del 0.4%.

### **2.4 Medio de fermentación (MFA)**

Tras mezclar bien las fases sólida y acuosa del CSL (Corn Steep Liquor) se pesaron 25g por cada litro de medio a preparar, se añadieron 20ml/l de solución de sales y se completó con agua milli-Q hasta el volumen de 1l. Después de que el medio fuera agitado durante 20 minutos y filtrado al vacío se ajustó el pH a 6.8 con NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. En el momento de su utilización se añadieron los suplementos necesarios para cada estirpe y las fuentes principales de carbono y nitrógeno, sacarosa al 3% (p/v) y 5mM de tartrato de amonio, respectivamente.

## 2.5 Soluciones y suplementos para medios de *Aspergillus*

### ➤ Solución concentrada de sales (50x)

Para la preparación de un litro de solución:

Cloruro de potasio (KCl) .....	26 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) .....	26 g
Fosfato dihidrógeno de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) .....	76 g
Solución de elementos traza sin fosfatos .....	50 ml

### ➤ Solución concentrada de casaminoácidos (100x)

Hidrolizado de caseína 150g/l. Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

### ➤ Solución concentrada de elementos traza sin fosfatos (1000X) (modificado en el laboratorio en 2007)

Para la preparación de 1 litro de solución:

Tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ).....	40 mg
Cloruro de cobre ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) .....	400 mg
Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) .....	800 mg
Cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) .....	8 g
Cloruro de magnesio ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).....	800 mg

### ➤ Solución concentrada de vitaminas (100x)

Para la preparación de 1 litro de solución:

Tiamina.....	50 mg
Biotina.....	10 mg
Ácido nicotínico.....	100 mg
D-pantotenato de calcio.....	200 mg



Piridoxina-HCl..... 50 mg

Riboflavina..... 100 mg

Ácido p-aminobenzoico (PABA)..... 100 mg

Inositol..... 24 g

Esterilizado mediante filtración y guardado a 4°C protegido de la luz.

➤ **Solución de glucosa (20%)**

Para la preparación de 1 litro de solución:

D-glucosa..... 200 g

Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

➤ **Solución concentrada de tartrato de amonio (100x)**

Para la preparación de 1 litro de solución:

Tartrato de amonio..... 92g

Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

➤ **Suplementos**

Todos los suplementos se prepararon en soluciones acuosas concentradas 100x respecto a la concentración final en el medio de cultivo, salvo que se indique lo contrario.

- Biotina (1000x): 100mg/l. Esterilizado por filtración.

- Ácido p-aminobenzoico (PABA): 200mg/l (1.4mM). Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

- D-Pantotenato de calcio: 600mg/l (2.4mM). Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

- Piridoxina-HCl (vitamina B6): 50mg/l (0.25mM). Esterilizado por filtración.

- Inositol: 12g/l (65mM). Esterilizado por filtración.

- Pantolactona-D: 200mg/l. Esterilizado en autoclave a 110°C durante 20 minutos.

- Riboflavina: 250mg/l (0.6mM). Esterilizado por filtración.

- Uracilo y uridina: pesados en el momento, 56g/100ml de uracilo y 122mg/100ml de uridina en el medio.

### **3.-Transformación de *Aspergillus nidulans***

La transformación de *A. nidulans* se realizó siguiendo el protocolo descrito en (Tilburn *et al.*, 1983). De forma general el protocolo se describe a continuación:

Se inocularon  $2 \times 10^6$  conidiosporas en 400ml de medio mínimo líquido de *Aspergillus* con las fuentes de carbono y nitrógeno estándares y los suplementos necesarios para su correcto crecimiento. El micelio del hongo se cultivó durante 14h a 30°C en agitación y se recolectó por filtración. Tras resuspender 1g del micelio húmedo en 20ml de Solución 2 (1.2M  $\text{MgSO}_4$ , 10mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH=5.8) se digirió con 200mg de Vinoflow® (Novozymes), enzima lítica de la pared celular, siendo incubada la mezcla a 30°C durante un periodo de 1 a 2h con agitación suave. La formación de protoplastos se comprobó mediante la observación de una muestra de la mezcla de digestión utilizando un microscopio con óptica de contraste de fase. La suspensión de protoplastos se dividió en partes iguales en dos tubos de 50ml (10ml/tubo) y a cada uno se le añadió igual volumen de Solución 5 (0.6M D-Sorbitol, 0.1M Tris-HCl pH=7.5) con mucha precaución, sin que las dos fases se mezclasen. Tras centrifugar la solución bifásica en la centrífuga Eppendorf 5810-R utilizando el rotor basculante A-4-44, refrigerado a 4°C durante 10min a 4400 rpm, el concentrado de protoplastos generado entre las dos fases fue recogido con una pipeta Pasteur estéril y diluido añadiendo 2 volúmenes de Solución 6 (1M D-Sorbitol, 10mM Tris-HCl pH=7.5). La suspensión de protoplastos se centrifugó de nuevo a 2800 rpm a 4°C durante 10min en la misma centrífuga, se separaron los protoplastos sedimentados y se resuspendieron en 1ml de Solución 6 para limpiarlos de impurezas. Los protoplastos fueron concentrados mediante centrifugación y resuspensión en Solución 7 (200  $\mu\text{l}$ /transformación) (1M D-Sorbitol, 10mM Tris-HCl pH=7.5, 10mM  $\text{CaCl}_2$ ). Una vez obtenidos los protoplastos comenzó el proceso de transformación. Para ello, se mezcló una suspensión de protoplastos en solución 7 con el DNA (vector o casete de transformación, generalmente 1-3 $\mu\text{g}$  de DNA) y 50 $\mu\text{l}$  de Solución 8 (PEG-6000 60% (p/v),

10mM Tris-HCl pH=7.5, 10mM CaCl<sub>2</sub>). Tras incubar la suspensión en hielo durante 20min se añadió 1ml de Solución 8 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 5ml de Solución 7 y 15ml de medio de regeneración top agar fundido. Finalmente, la mezcla se repartió sobre la superficie de placas de *Petri* que contenían medio mínimo de regeneración con los requerimientos necesarios. Las colonias generadas a partir de los protoplastos transformados se observaron tras 3-4 días de incubación a 37°C. Los transformantes fueron purificados y analizados por la técnica de “*Southern-Blot*”, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.

## **4.- Aislamiento y manipulación de ácidos nucleicos**

### **4.1 Construcción de mutantes nulos y etiquetados**

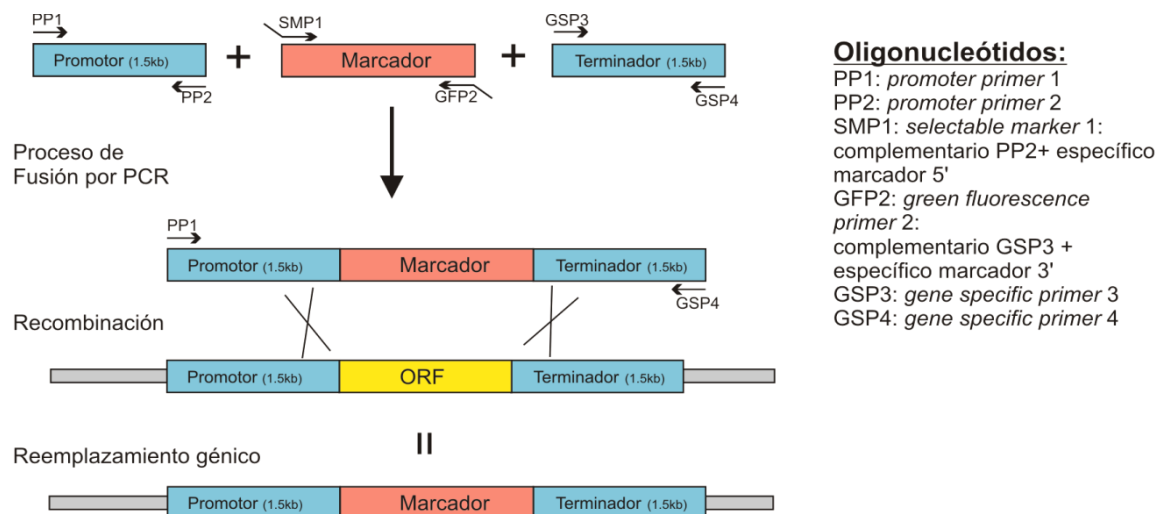
Para estas dos técnicas se siguió el protocolo descrito por (Yang *et al.*, 2004) y en nuestro laboratorio se han introducido las modificaciones que a continuación se detallan (Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2011). Así, los mutantes nulos se obtuvieron transformando la cepa correspondiente con un fragmento lineal de DNA que contenía las regiones flanqueantes 5’ y 3’ del ORF del gen cuyo nulo se quería realizar, y entre ambos fragmentos, fusionado por PCR, el marcador de auxotrofía (figura M&M-1).

Para los etiquetados, tanto con GFP como con 3xHA, se siguió el mismo protocolo, con pequeñas diferencias que se explican a continuación y que varían en función del proceso de etiquetado en el extremo C- o N-terminal de la proteína:

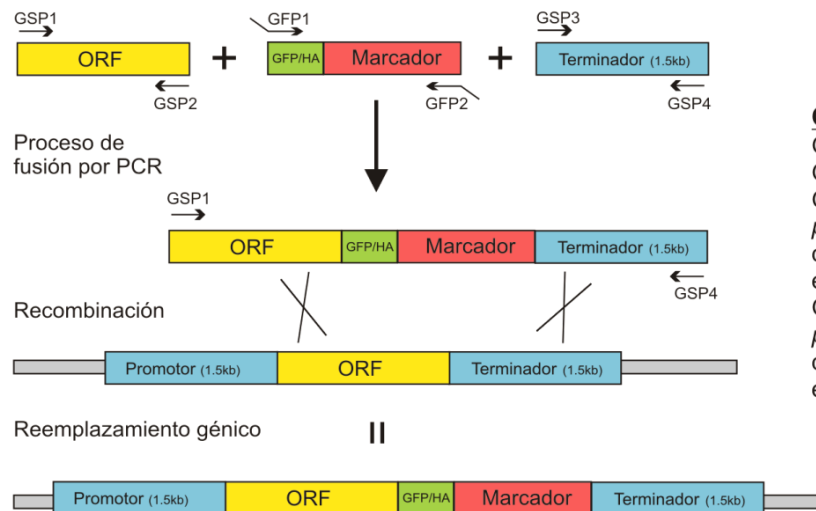
- Etiquetado en el C-terminal: el fragmento de DNA con el que se transforma contiene la región del ORF, la proteína fluorescente + marcador y por último la región flanqueante 3’ (figura M&M-2.A).

- Etiquetado en el N-terminal: el fragmento de DNA con el que se transforma contiene la región flanqueante 5’, la proteína fluorescente + la región del ORF, y por último la región flanqueante 3’ (figura M&M-2.B). El fragmento de fusión se introduce en una cepa nula en lugar de utilizar una cepa silvestre. El alelo nulo debe haber sido generado mediante reemplazamiento génico de la secuencia codificante de interés por la unidad génica *pyrG*<sup>Af</sup>. Tras la transformación para seleccionar positivamente aquellos transformantes en

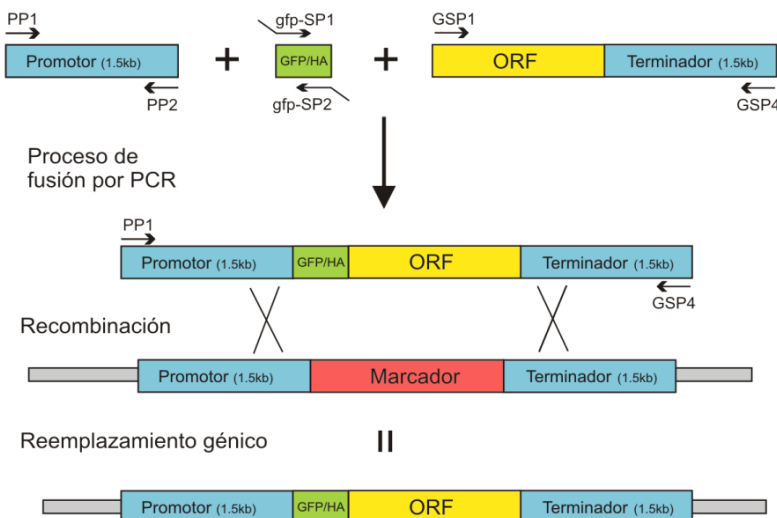
los que se haya producido el reemplazamiento del alelo nulo se toma ventaja de la sensibilidad que produce un alelo silvestre *pyrG* frente al compuesto 5-FOA. De esta forma se añade al medio de regeneración 2mg/ml de 5-FOA y uridina/uracilo a las concentraciones normalmente utilizadas para complementar a los mutantes *pyrG*<sup>-</sup>, como *pyrG89*. Los transformantes seleccionados para posteriores estudios poseen un fenotipo de auxotrofia para la biosíntesis de pirimidinas.



**Fig. M&M-1: Generación de mutante nulo:** En primer lugar se amplifica cada uno de los fragmentos a fusionar por separado. Por un lado, se amplifican el promotor y el terminador (en azul) del gen que se quiere deletar mediante los oligonucleótidos PP1/PP2 y GSP3/GSP4 respectivamente, y por otro lado, el marcador de selección (en rojo) que será el que sustituya al gen original (en amarillo) mediante los oligonucleótidos SMP1/GFP2. Estos oligonucleótidos portan una región complementaria a los fragmentos con los que posteriormente se fusionará este fragmento. En un segundo paso, se genera el casete de fusión mediante PCR utilizando los oligonucleótidos PP1/GSP4. Un doble suceso de recombinación homóloga en el locus diana permite generar el alelo nulo.

**-Etiquetado en C-terminal:****Oligonucleótidos:**

GSP1: *gene specific primer 1*  
 GSP2: *gene specific primer 2*  
 GFP1: *green fluorescence primer 1*:  
 complementario GSP2+  
 específico epítipo 5'  
 GFP2: *green fluorescence primer 2*:  
 complementario GSP3 +  
 específico marcador 3'

**-Etiquetado en N-terminal:****Oligonucleótidos:**

PP1: *primer specific primer 1*  
 PP2: *primer specific primer 2*  
 gfp-SP1: *gfp starting primer 1*:  
 complementario PP2+  
 específico epítipo 5'  
 gfp-SP2: *gfp finishing primer 2*:  
 complementario GSP1 +  
 específico epítipo 3'  
 GSP1: *gene specific primer 1*  
 GSP4: *gene specific primer 4*

**Fig. M&M-2: Generación de mutante etiquetado:** *Etiquetado en C-terminal:* En primer lugar se amplifica el gen de interés (ORF, en amarillo) y su terminador (en azul) a partir de DNA genómico. Por otro lado, se amplifica el epítipo (en verde) junto con el marcador de selección (en rojo) por PCR. El casete generado a partir de la fusión de los 3 fragmentos mediante PCR se utiliza para la transformación de una cepa silvestre en la que gracias a un doble proceso de recombinación homóloga en el locus diana se obtiene el mutante etiquetado en el extremo carboxilo terminal. *Etiquetado en N-terminal:* En este caso se amplifica el promotor (en azul) por un lado y el gen de interés (ORF, en amarillo) junto con su terminador (en azul) por otro, a partir de DNA genómico. De manera independiente se amplifica el epítipo (en verde). Todos ellos se fusionan y el casete resultante se utiliza en la transformación de una cepa nula para el gen de interés. Como en el caso anterior, un doble evento de recombinación homóloga permite la sustitución del marcador por el gen de interés etiquetado en el extremo N-terminal.

#### 4.2 Extracción de DNA genómico de *Aspergillus nidulans*

Para proceder a la extracción del gDNA se recolectaron 300mg de micelio mediante filtración del cultivo a través de Miracloth (muselina con un poro de 22-25µm Calbiochem 475855), se congelaron en nieve carbónica y posteriormente se liofilizaron durante 10h en un liofilizador Cryodos (Telstar). La masa de micelio se trituró utilizando un molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant a potencia 4 durante 20 segundos y utilizando una bola de cerámica de 0.55cm procedente del kit FastDNA Kit de BIO101 (Q-Biogen). El micelio pulverizado se resuspendió en 1ml de tampón de solución de lisis: 25mM Tris-HCl pH=8.0, 0.25M sacarosa y 20mM EDTA. Una vez homogeneizada la suspensión se añadieron 100µl de SDS al 10% y se incubó durante 15 minutos a 65°C. Al extracto fúngico se le añadió 1ml de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó dicha mezcla vigorosamente para así eliminar proteínas y otros compuestos orgánicos. Las fases acuosa y orgánica fueron separadas centrifugando cada muestra durante 5 minutos a 13000rpm. La fase acuosa fue recogida y sometida nuevamente al mismo proceso de lavado. El gDNA se precipitó añadiendo 1/10 del volumen de acetato sódico 3M, pH=6.0 y 0.6 volúmenes de isopropanol respecto a lo recogido de DNA. A continuación, se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 13000rpm para sedimentar el gDNA precipitado y se lavó con 1ml de etanol al 80%. Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante, se secó el sedimento y se resuspendió en 300-500µl de agua milli-Q autoclavada. Para eliminar la posible contaminación de RNA se incubó cada muestra con 5mg/ml de RNasa-A (Roche) a 37°C durante 60 minutos. El gDNA se precipitó nuevamente utilizando acetato sódico e isopropanol y se sedimentó mediante centrifugación como se indica anteriormente. El gDNA sedimentado se lavó nuevamente con 0.5ml de una solución de etanol al 80% y una vez seco el gDNA se resuspendió en 100-200µl de agua milli-Q almacenándolo a -20°C hasta su utilización.

#### 4.3 Extracción de RNA total de *A. nidulans*

Las muestras cultivadas en el medio mínimo descrito en el apartado 2.1 fueron filtradas y congeladas en nitrógeno líquido inmediatamente. Éstas fueron molidas en mortero con ayuda del nitrógeno líquido, evitando en todo momento que las muestras se descongelaran. El triturado de micelio obtenido se transfirió a tubos de 2ml, añadiendo a cada tubo 1ml de solución TriReagent (Fluka) y mezclando por vortex hasta humedecer todo el micelio. Tras incubar los tubos 5min a temperatura ambiente, invirtiéndolos periódicamente, se añadieron 0.2ml de cloroformo/muestra y se dejaron reposar 3min nuevamente a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron las muestras a 12000g durante 15min a 4°C y se transfirió la fase acuosa (fase superior), a tubos nuevos de 2ml. Se repitió todo el proceso una segunda vez, esta vez utilizando 0.75ml de solución TriReagent. A esta segunda fase acuosa, se le añadió 0.5ml de isopropanol y se incubó durante 10min a temperatura ambiente, mezclando periódicamente por inversión y centrifugando después a 12000g durante 10min a 4°C, precipitando así el RNA. A continuación, se eliminó el sobrenadante por vacío y se añadió 1ml de una solución de etanol/agua tratada con DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma) al 75% (v/v). Tras mezclar y disolver el RNA, se centrifugaron las muestras a 7500g durante 5min a 4°C. Se volvió a eliminar el sobrenadante por vacío y se disolvieron las muestras en 20-200µl de agua tratada con DEPC (libre de RNasa), midiendo la cantidad de RNA total extraído en cada muestra mediante el sistema QuBit™ (Invitrogen).

#### 4.4 Southern-blot

Se utilizó esta técnica para comprobar la correcta inserción de las diferentes moléculas de DNA con las que se transformaron las cepas de *A. nidulans*. El protocolo seguido fue el descrito en (Sambrook *et al.*, 1989). Los DNA aislados fueron digeridos con una enzima de restricción que permitiría establecer un patrón diferencial de bandas para distinguir la alteración en el locus de interés. Tras separar los diferentes productos de la digestión del genoma en un gel de 0.8% de agarosa/TAE, se rompió el DNA mediante tratamiento de 5 minutos con luz UV, 320nm. El DNA digerido se desnaturalizó sumergiendo el gel en solución desnaturalizante (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) durante 45min

y posteriormente se neutralizó el pH del gel utilizando la solución neutralizante (0.5M Tris-HCl pH=7.5, 3M NaCl). Tras esta segunda incubación se lavó el gel con solución 2xSSC (3M NaCl y 300mM citrato trisódico, pH=7.4) y se preparó la transferencia de los fragmentos de DNA a una membrana de nylon (Nytran SPC, Whatman) utilizando el protocolo estandarizado de transferencia por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989). El DNA fragmentado se fijó a la membrana exponiendo ésta durante 5 minutos a luz UV, utilizando para ello un transiluminador (Biorad GelDoc System). La membrana fue incubada en solución de hibridación de Church (para 200ml: 2g BSA, 400µl EDTA, 70ml SDS 20x, 30ml H<sub>2</sub>O, 60ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ajustado a pH=7)(Church and Gilbert, 1984) durante 1-2 horas, antes de proceder a la hibridación con una sonda específica de DNA marcada radiactivamente con  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP (Perkin Elmer). El marcaje se realizó utilizando el kit Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana se incubó con la sonda radioactiva 16h a 55°C. Para lavar la sonda radioactiva no hibridada se realizaron diferentes lavados, en primer lugar dos lavados con 50ml cada uno utilizando una solución 2x SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente y posteriormente dos lavados con 50ml de una solución 0.2x SSC/0.1% SDS. En la segunda tanda de lavados, tras cada uno de ellos, se monitorizó la radioactividad remanente en el filtro con un Geiger.

#### 4.5 Northern-blot

Esta técnica fue utilizada para los análisis de expresión génica, utilizando los RNA totales extraídos según el apartado 4.3 de esta misma sección de Materiales y Métodos. Se corrieron un total de 10µg de RNA total de cada muestra o condición en un gel desnaturante de agarosa/formaldehído. Para preparar un gel de 100ml se fundió 1.2g de agarosa en 72ml de agua tratada con DEPC, se añadió a continuación 10ml de tampón MOPS 10x (0.4M MOPS (Sigma), 0.1M acetato sódico, 0.01M EDTA), y finalmente cuando la temperatura de la solución había bajado a 42-48°C se añadieron 18ml de formaldehído. El gel se dejó solidificar en su correspondiente bandeja de electroforesis en la campana extractora de humos. Las muestras por su parte, se prepararon añadiendo 12.5µl de



formamida, 4µl de formaldehído (33%), 2.5µl de MOPS 10x y el volumen adecuado de cada muestra de RNA en un total de 10µl con agua tratada con DEPC.

Tras incubar las muestras preparadas durante 15min a 65°C, se añadió la solución de carga, y se corrieron en el gel a 30-40V en solución MOPS 1x, durante 16 horas. La transferencia del RNA por capilaridad a membrana de Nylon se realizó de la misma manera que en el caso del “*Southern-blot*” (apartado 4.4 de M&M). Como paso previo a la transferencia por capilaridad el gel fue lavado con agua para eliminar el formaldehído remanente y el exceso de bromuro de etidio con el que se visualiza la calidad y se controla la carga de cada muestra. La fijación del RNA a la membrana y la hibridación con la sonda radiactiva correspondiente también se desarrollaron de la misma manera que en el apartado anterior.

#### 4.6 Mutagénesis dirigida de *FlbB*

Esta técnica se utilizó para generar mutaciones puntuales en *flbB*, así como en los truncamientos de *flbB* generados en el plásmido pBSK-pyroA. En primer lugar, se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos. Ambos *primers* deben contener la mutación y su secuencia debe ser igual a la del plásmido y entre ellas, pero en dirección opuesta. Los oligonucleótidos deben tener una longitud de entre 25 y 45 bases, conteniendo la mutación en la mitad y al menos 10-15 bases de la secuencia original a cada lado. Su  $T^m$  debe ser alta, se recomienda al menos 78°C. Siguiendo la norma habitual, es aconsejable que el porcentaje de guaninas y citosinas supere el 40% y que la secuencia acabe en alguna G o C. A continuación, se realiza una PCR y su producto se digiere con la enzima de restricción *DpnI*, la cual es capaz de digerir el DNA metilado y hemimetilado, permitiendo el aislamiento del plásmido recién generado portador de la mutación en ambas hebras del DNA, para su posterior transformación en *E. coli*.

## **5.- Técnicas de biología molecular para *Escherichia coli***

### **5.1 Condiciones y medio de cultivo para *E. coli***

Como medio de cultivo para *E. coli* se utilizó LB, Luria-Bertani (Sambrook *et al.*, 1989), el cual contiene: Bactotripton 10g/l, extracto de levadura 5g/l y NaCl 5g/l. El pH se ajustó a 7.5 con hidróxido sódico y en el caso del medio sólido se añadió 1% (p/v) de agar. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Para la propagación de plásmidos y la selección de cepas transformantes se utilizó el antibiótico ampicilina a una concentración de 100µg/ml.

### **5.2 Transformación de *E. coli***

Se utilizó la técnica del shock térmico para la transformación de células competentes de la cepa *DH1* de *E. coli*. En un tubo se mezclaron 100µl de células competentes con la cantidad adecuada de DNA. La mezcla se mantuvo en hielo durante 20min, se incubó a 37°C durante 2 min y se volvió a dejar en hielo durante 1min. Tras añadir 1ml de medio LB, se incubó la mezcla a 37°C y 250rpm, durante 1h. Volúmenes variables de la mezcla de transformación fueron inoculados sobre medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado.

### **5.3 Extracción de DNA plasmídico**

La colonia bacteriana con DNA plasmídico a extraer fue inoculada en 10ml de medio LB líquido suplementado con el antibiótico correcto. Se cultivó la mezcla a 37°C y 250rpm, durante 15 horas, para posteriormente extraer el DNA de plásmido mediante el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). La correcta extracción fue verificada mediante electroforesis de agarosa (0.8% p/v) en TAE 1x.

#### **5.4 Expresión de proteínas recombinantes de *E. coli***

La expresión se llevó a cabo en la cepa *DH1* de *E. coli* transformada con el plásmido de expresión adecuado (normalmente pGEX-2T). Se cultivó la bacteria en 10ml de medio LB con antibiótico a 37°C durante 16 horas. Se diluyeron 2ml del cultivo en un volumen final de 100ml de LB + antibiótico y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una  $OD_{600} = 0.5-0.8$ . En ese momento se añadió IPTG hasta una concentración final de 0.1mM y se incubó durante 24h a 15°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4000rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 15ml de PBS (150mM NaCl, 200mM  $Na_2HPO_4$ , 5mM  $NaH_2PO_4$ ) al que se había añadido los siguientes inhibidores de proteasas: 1mM Pefabloc, 1μM Pepstatina y 0.6μM Leupeptina. Las células fueron lisadas utilizando una French Press, realizando 3 pasos a 1200psi, y se centrifugaron a 14000rpm durante 25 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante.

### **6.- Aislamiento y manipulación de proteínas de *A. nidulans***

#### **6.1 Extracción de proteína total**

Los extractos proteicos totales de las distintas cepas de *A. nidulans* se obtuvieron siguiendo dos protocolos diferentes, dependiendo de su uso exclusivo para detección por “Western-blot” (método 1) o para manipulación en posteriores experimentos (método 2). En ambos procedimientos se partió de micelio liofilizado y triturado en la Fast Prep Cell Disruptor a una velocidad de 4.0 durante 20 segundos.

##### **Método 1:**

Se partió de micelio triturado proveniente de cultivos en medio líquido y se separaron 6-7mg de micelio que fueron resuspendidos en 1ml de tampón de lisis (0.2M NaOH y 0.2% β-mercaptoetanol en  $H_2O$ ). Se precipitaron las proteínas añadiendo TCA al 7.5% y se incubaron en hielo durante 10min. Seguidamente, se centrifugaron a 14000rpm a 4°C durante 5min 2 veces y se retiró el sobrenadante. Sobre el pellet se añadió 100μl de Tris Base 1M y se mezcló bien. Finalmente se añadieron 200μl de Tampón de Ruptura

(62.5mM Tris-HCl pH=6.8, 2% SDS (p/v), 5%  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v), 6M urea, 0.05% azul de bromofenol (p/v)), se mezcló la suspensión en el vórtex y se hirvieron las muestras durante 2min a 90°C, centrifugando a continuación. Se repitió el paso de hervido y centrifugación de las muestras antes de cargarlas en un gel de SDS-poliacrilamida.

### **Método 2:**

En este caso, se trabajó a partir de 200-250mg de micelio pulverizado proveniente de cultivos en medio de fermentación (ver apartado 2.4 de M&M). Se resuspendió en 1ml de tampón de extracción de proteínas NP-40 (5mM Hepes pH=7.5, 1mM EDTA, 20mM KCl, 0.1% NP-40, 0.5mM DTT e inhibidores (1mM Pefabloc, 1 $\mu$ M Pepstatina, 0.6 $\mu$ M Leupeptina)) y se incubó durante 1h a 4°C mezclándose continuamente por inversión en un agitador de noria. Tras centrifugar las muestras durante 30 minutos a 14000g y 4°C, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para analizar las muestras mediante “*Western-blot*”, se precipitaron 50 $\mu$ g de extracto de proteínas de cada muestra utilizando TCA 10% (v/v) e incubando la mezcla en hielo durante 10 minutos. Las proteínas se sedimentaron centrifugando 5min a 14000rpm y 4°C y se lavaron con mezclas de Etanol/Eter 1:1 y 1:3, consecutivamente. Finalmente, cada sedimento de proteínas se secó por evaporación del remanente de solución de lavado y se resuspendió en 20 $\mu$ l de tampón de ruptura. Los extractos proteicos desnaturalizados se calentaron a 95°C durante 5 minutos, como paso previo a su carga y análisis por electroforesis de SDS-poliacrilamida.

### **6.2 Western-blot**

La separación monodimensional de los extractos proteicos se realizó mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con SDS, SDS-PAGE. Las muestras de proteínas fueron precipitadas, resuspendidas en tampón de ruptura y desnaturalizadas a 90-95°C como se explica en el apartado anterior y analizadas en geles desnaturalizantes del 10% SDS-poliacrilamida (sistema MiniProtean 3 de BioRad) (Laemmli, 1970). Parte de los geles se tiñeron con la solución Biosafe Coomassie Staining

(BioRad) para visualizar las bandas correspondientes a cada proteína o grupo de éstas con la misma movilidad electroforética. Duplicados de los geles anteriores portaban las proteínas que fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y detectadas según cada antígeno o epítipo, con los anticuerpos primarios detallados en la tabla M&M-3 siguiente. En todos los casos el anticuerpo secundario estaba conjugado a la peroxidasa de rábano. La actividad peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham).

Tabla M&M-3: Anticuerpos utilizados en esta tesis.

ANTICUERPOS		DILUCIÓN	FUENTE	REFERENCIA
Primarios	$\alpha$ - GFP	1:5000	ratón	Roche
	$\alpha$ - actina	1:50000	ratón	ICN Biomedicals Inc.
	$\alpha$ - cMyc	1:10000	ratón	Sigma
	$\alpha$ - HA	1:1000	rata	3F10 Roche
	$\alpha$ - mRFP	1:4000	conejo	R1310 Pab Rbx USBiological
	$\alpha$ - hexoquinasa	1:80000	conejo	Chemicon Intern. Inc.
Secundarios <i>conjugados a peroxidasa</i>	$\alpha$ - mouse IgG	1:4000	cabra	115-035-003 Jackson ImmunoResearch Laboratories INC
	$\alpha$ - rat IgM + G	1:4000	cabra	3010-05, Southern Biotech
	$\alpha$ - rabbit IgG	1:3000	asno	Sigma

## **7.- Pull-down**

Los experimentos de interacción proteína-proteína (*pull-down*) se realizaron utilizando proteínas de fusión GST expresadas en *E. coli* y extractos proteicos totales de *A. nidulans*. La proteína de fusión fue unida a la resina de glutatión-tio-sefarosa (Amersham), previamente lavada con PBS (150mM NaCl, 200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) al que se le habían añadido los inhibidores de proteasas (1mM Pefabloc, 1μM Pepstatina, 0.6μM Leupeptina). Se incubó la fracción soluble del extracto de *E. coli* con esta resina durante 1h a 4°C en un agitador de noria. Posteriormente, la resina con la proteína unida se volvió a lavar con PBS + inhibidores de proteasas para retirar las proteínas de *E. coli* que pudieran haberse quedado inespecíficamente atrapadas en la resina y se incubó de nuevo durante 1h con 2mg del extracto proteico de la cepa de *A. nidulans* que expresa la proteína de interés etiquetada. Una vez transcurrido ese tiempo, la resina que contenía los posibles complejos de interacción fue lavada, para finalmente resuspenderla en tampón de ruptura (62.5mM Tris-HCl pH=6.8, 2% SDS (p/v), 5% β-mercaptoetanol (v/v), 6M urea, 0.05% azul de bromofenol (p/v)). La muestra se analizó mediante SDS-PAGE con tinción Coomassie, y “Western-blot” (ver apartado 6.2 de M&M) para determinar la interacción proteína-proteína bajo análisis.

## **8.- Fraccionamiento subcelular**

Este protocolo se basa en el desarrollado con *S. cerevisiae* y adaptado para su uso en *A. nidulans* como se describe en (Rodriguez-Galan *et al.*, 2009). Los primeros pasos son comunes al proceso de obtención de protoplastos para la transformación de *A. nidulans*. Las soluciones también son las mismas y están descritas anteriormente (ver apartado 3 de esta misma sección). Una vez obtenidos los protoplastos, se desarrolla el protocolo específico de fraccionamiento celular.

A una suspensión de 10<sup>8</sup> protoplastos/ml se añadió 1ml de tampón de lisis de protoplastos (200mM sorbitol, 50mM acetato sódico, 20mM Hepes pH=7.5, 2mM EDTA) y se procedió a su lisado mecánico utilizando un “Dounce” y aplicando 20 pasos enérgicos

del émbolo. Del lisado obtenido se separaron 100µl que fueron posteriormente precipitados con TCA (ver protocolo descrito en el apartado 6.1) y resuspendidos en 50µl de tampón de ruptura, denominando esta mezcla extracto total (ET). El resto del lisado se centrifugó a 300g durante 5 minutos a 4°C utilizando una centrífuga de mesa refrigerada. El sedimento, correspondiente a las membranas y a los grandes agregados celulares, se resuspendió en 400µl de tampón de lisis y se precipitó también con TCA; a esta fracción se le denominó P0.3K. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13000g durante 15 minutos a 4°C. Al sedimento obtenido se le añadieron 400µl de tampón de lisis y se precipitaron las proteínas utilizando TCA. A esta fracción se le denominó P13K y debe contener proteínas de membranas y de los distintos orgánulos. El sobrenadante se centrifugó a 100000g durante 1 hora y 5 minutos a 4°C empleando una ultracentrífuga Beckman TL100 y un rotor de ángulo fijo modelo TLA-100.2. Las proteínas del sobrenadante obtenido se precipitaron de forma similar a lo indicado anteriormente utilizando TCA. La fracción se denominó SB100K y corresponde a las proteínas solubles citoplásmicas. El sedimento obtenido se resuspendió en 400µl de tampón de lisis y las proteínas se precipitaron con TCA. En esta fracción, denominada P100K, se encuentran las proteínas correspondientes a vesículas de transporte y restos de membranas endosomales y del complejo de Golgi. La presencia de las proteínas de interés en cada una de las diferentes fracciones se caracterizó mediante la técnica de “*Western-blot*” (ver sección 6.2 de M&M).

## **9.- Microscopía de fluorescencia**

Para la observación de la localización de las proteínas se utilizó un microscopio vertical de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i. Se utilizó el objetivo de 60 aumentos Plan Apo 1.4N.A (Nikon), una lámpara de mercurio de 100W y filtros GFP-3035 (Semrock Brighthline), TXRED-4040B (Semrock Brighthline) y UV-2 (360-460nm) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP, CherryRed y DAPI respectivamente. Para la observación *in vivo* se utilizó un microscopio invertido Leica DMI6000B (Deerfield, IL) equipado con un incubador Tempcontrol 37-2 digital, (PeCon), un filtro TX2 (Leica) para la detección de

mCherryRed y un filtro GFP-3035B (Semrock Brighline) para la detección de la fluorescencia emitida por GFP, una lámpara externa EL6000 para la excitación de epifluorescencia y un objetivo HCX 63x 1.4N.A. Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital ORCA-ER II (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ) y el programa de obtención y tratamiento de imagen fue el Metamorph (Universal Image). También se utilizó el programa Image J, de libre acceso, para la visualización de las imágenes.

Para cada observación del hongo en el microscopio vertical, se inocularon las conidiosporas resuspendidas en 10µl de solución de Tween 80 (diluido  $10^4$  veces) sobre cubreobjetos de vidrio redondo de 14mm de diámetro sumergidos en 2ml de MMA-P (medio mínimo sin fosfatos) con D-glucosa 1% (p/v),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25mM, tartrato de amonio 5mM y los suplementos para cada cepa. Los cubreobjetos se colocaron en placas de 12 pocillos y se incubaron a 25°C durante 16-18h.

Para la observación en el microscopio invertido se inoculó la solución de conidiosporas en placas redondas de 22mm (Willco-Dish) con fondo de cristal. Para la observación de la posición de los núcleos de algunas cepas se utilizó la tinción de DAPI: las muestras se incubaron durante 10min con una solución de 0.07µg/ml del colorante DAPI en glicerol al 50%.

## **10.- Herramientas bioinformáticas**

Para la búsqueda de secuencias se utilizaron las bases de datos del Broad Institute y del National Institute of Allergy and Infectious Diseases citadas en el apartado 1 de la Introducción. La realización y el análisis de las diferentes construcciones se llevó a cabo gracias al programa Vector NTI (Invitrogen).

Las imágenes de los “*Western-blot*” se obtuvieron mediante un Analizador de Imágenes de Quimioluminiscencia, 06-LAS3000Q (TDT) de FUJI y se analizaron con el programa Multi Gauge V3.0 de Fujifilm. En los “*Southern*” y “*Northern-blot*” se utilizó una pantalla BAS-MS (Fujifilm) para detectar la señal emitida por la radiactividad utilizando un Phosphorimager Fujifilm FLA-3000. Las imágenes se procesaron y analizaron con el programa informático Multi Gauge V3.0 (Fujifilm).



Los alineamientos múltiples fueron realizados con el programa Clustal X o W (Thompson *et al.*, 1997) y el programa GeneDoc facilitado por el Sistema de Recursos de Supercomputación de Pittsburgh. Los logos de secuencia utilizados para visualizar las posible dianas para una mutagénesis dirigida de FlbB se crearon con el programa Weblogo (Crooks *et al.*, 2004).

En el estudio relativo a la proteína GmcA, se utilizó la base de datos del NCBI, National Center for Biotechnology Information protein database, y se siguió el método Phylip para los análisis filogenéticos (para más detalles ver (Etxebeste *et al.*, 2012)).

## **11.- Extracción de toxinas y recuento de cleistotecios y conidias**

Los experimentos realizados durante mi estancia en el laboratorio de la Dra. Calvo en USA, se llevaron a cabo de la siguiente manera: en todos los casos se partió de colonias cultivadas sobre medio GMM sólido (20ml/l solución de sales, 10g/l de D-glucosa, 15g/l de agar y ajustado el medio a pH=6.5; una vez autoclavado se añadió NaNO<sub>3</sub> a una concentración final de 10mM) durante 7 días a 37°C en presencia de luz y oscuridad en las que se inocularon las esporas de cada cepa mezcladas con GMM-TOP (mismos componentes que el GMM, pero con 0.4% agar) para su distribución homogénea. Transcurrido el tiempo de incubación, se analizaron en cada caso como se detalla a continuación.

### **11.1 Extracción de toxinas**

Se recogieron 3 discos de 16mm de diámetro de cada colonia crecida como se indica anteriormente. Los tres discos se introdujeron en un tubo Falcon de 50ml y se añadió 5ml de cloroformo para la extracción de metabolitos secundarios solubles en fase orgánica. Tras 1h de incubación a temperatura ambiente, se agitó utilizando un vortex y se recogió la fase orgánica evitando la acuosa formada principalmente por restos celulares y del medio de cultivo. Se dejó que se evaporara el cloroformo durante 16 h y se volvió a resuspender la muestra desecada nuevamente en 500µl de cloroformo para analizar 25µl de ellos por cromatografía en capa fina (TLC). Como control de movilidad de

la toxina se utilizó un preparado comercial (Sigma) de esterigmatocistina, ST, en la placa de silica-gel. El solvente utilizado durante la TLC fue benceno/ácido acético glacial en una proporción 95:5. Posteriormente, se reveló la cromatografía pulverizando una solución de  $\text{AlCl}_3$  al 12.5% p/v en etanol, sobre la matriz y se secó a 80°C para finalmente, visualizar la banda correspondiente a la toxina ST bajo luz UV (375nm).

### **11.2 Recuento de cleistotecios**

Se recogieron 3 discos de 16mm de diámetro de una colonia de cada cepa del mismo modo que en el apartado anterior, se pulverizaron con una solución de etanol al 75% para eliminar de la superficie las estructuras de esporulación asexuales y se contaron los cleistotecios con una lupa binocular a 20x aumentos.

### **11.3 Recuento de conidias**

En este caso se recogieron 3 discos de menor diámetro, 7mm, se pusieron en un tubo de 1.5ml y se les añadió 500µl de  $\text{H}_2\text{O}$ , para posteriormente, utilizando un palillo de goma, rascar la superficie del disco separando todas las esporas del disco de agar. A continuación, se hicieron diferentes diluciones y se contó el número de esporas en un hemocitómetro con un microscopio y óptica de contraste de fase.

## **12.- Monitorización de los niveles de germinación, crecimiento y conidiación en los estudios sobre las oxilipinas**

Todos los cultivos analizados partieron de suspensiones de esporas de diferentes cepas. Las esporas fueron recogidas de cultivos sólidos incubados durante 7 días, añadiendo 10ml de  $10^{-4}$  Tween 80 y recogéndolas con ayuda de un asa de vidrio estéril. Las suspensiones de esporas fueron filtradas y centrifugadas a 4000g previamente a su inoculación, lavándolas hasta 3 veces, para dejarlas libres de posibles autoinhibidores.

La germinación de las conidias se estudió en medio líquido utilizando diferentes concentraciones de esporas o inhibidor, analizando al menos 500 germínulas en el microscopio.

La inhibición del crecimiento tras la adición de la propia suspensión de esporas tras 7 días de incubación o de las oxilipinas comerciales, fue monitorizada tal y como se describe en (Chitarra *et al.*, 2004).

La inhibición tanto de la germinación como del crecimiento causada por el 1-octen-3-ol se estudió en medio líquido, inoculando  $10^5$  conidias/ml de las cepas RRMD3.4 o MAD2446 (ver tabla de cepas en la sección 1.1 de M&M) en presencia o ausencia de 4mM del 1-octen-3-ol cultivándolo a 37°C en un agitador orbital. Tras su filtración por membranas de 0.45µm de tamaño de poro, se resuspendieron para su observación en el microscopio. Las imágenes se tomaron utilizando la óptica Nomarski en los siguientes tiempos: t=0, t=4h, t=6h y t=16h. Se midió el diámetro de las conidias mediante el software Image J. Además, las conidias expuestas al 1-octen-3-ol durante 4h fueron transferidas a medio fresco y se midió su diámetro tras 2h, 4h y 6h tras el cambio, para comprobar la reversibilidad del efecto. La cepa MAD2446 permitió localizar los núcleos en estas condiciones gracias al marcaje de la histona con el epítipo CherryRed.

El nivel de conidiación de la colonias fue determinado usando la metodología descrita en (Calvo *et al.*, 1999). Brevemente, los compuestos de 8 carbonos fueron utilizados para empapar discos de papel de filtro de 12.5mm de diámetro y colocados en el centro de placas pequeñas de 55m sobre una capa de  $10^5$  conidias. El nivel de conidiación se determinó tras un recuento de esporas en el hemocitómetro.

## **RESULTADOS**



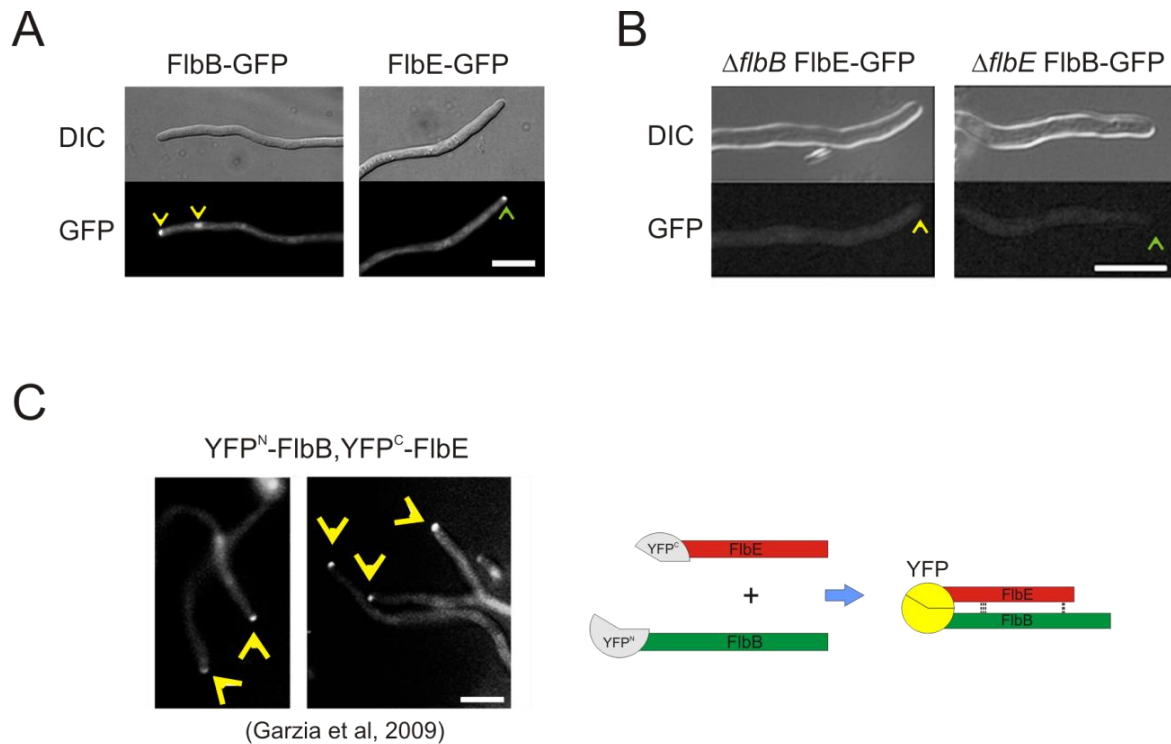
## **1.- Relación molecular entre FlbB y FlbE**

Estudios previos realizados por nuestro equipo y en los que he participado, han permitido demostrar la interrelación existente entre los factores tempranos UDA, FlbB y FlbE (ver apartado 3 de la Introducción). Así, las proteínas FlbB y FlbE colocalizan en la punta de la hifa (figura R-1.A) y dicha distribución celular es interdependiente, puesto que la ausencia de una de las proteínas causa la deslocalización de la otra (figura R-1.B) (Garzia *et al.*, 2009). Además, el ensayo de Complementación Bimolecular de Fluorescencia utilizando la proteína YFP sugirió la existencia de un contacto directo entre FlbB y FlbE. La detección en la punta de la hifa de la fluorescencia generada por la YFP reconstituida evidenció la proximidad que debía existir entre las dos mitades en las que se encontraba dividida la YFP y que etiquetaban el extremo N-terminal de FlbB y FlbE (figura R-1.C). De este modo, se describió la existencia de un complejo en la punta de la hifa formado, al menos, por FlbB y FlbE y que fue denominado Complejo Apical (Garzia *et al.*, 2009). Los restantes factores UDA estudiados, FlbA, FlbC y FlbD no deben formar parte del complejo apical dado que ninguno de ellos se acumula en la punta de la hifa, aunque no podemos excluir una participación menor en la formación del complejo (Garzia *et al.*, 2010; Garzia, 2011; Kwon *et al.*, 2010a).

Parte del trabajo realizado dentro de esta tesis se centra en el estudio de la interacción entre estas dos proteínas Flb y se ha abordado tanto desde una aproximación bioinformática como bioquímica mediante ensayos de interacción *in vitro*.

### **1.1 Análisis bioinformáticos**

Los análisis bioinformáticos fueron llevados a cabo por el Dr. Cortese (ver apartado 5 de la Introducción), colaborador del grupo, quien estudió los productos de los genes ortólogos de FlbB en diferentes especies fúngicas sobre todo en el subfilo Pezizomicotina. Comparó la secuencia de los ortólogos de FlbB codificados en genomas de ascomicetos que contenían o no un gen codificante para una proteína similar a FlbE, es decir los de la orden Eurotiales dentro de la clase Eurotiomicetos frente a las otras clases,



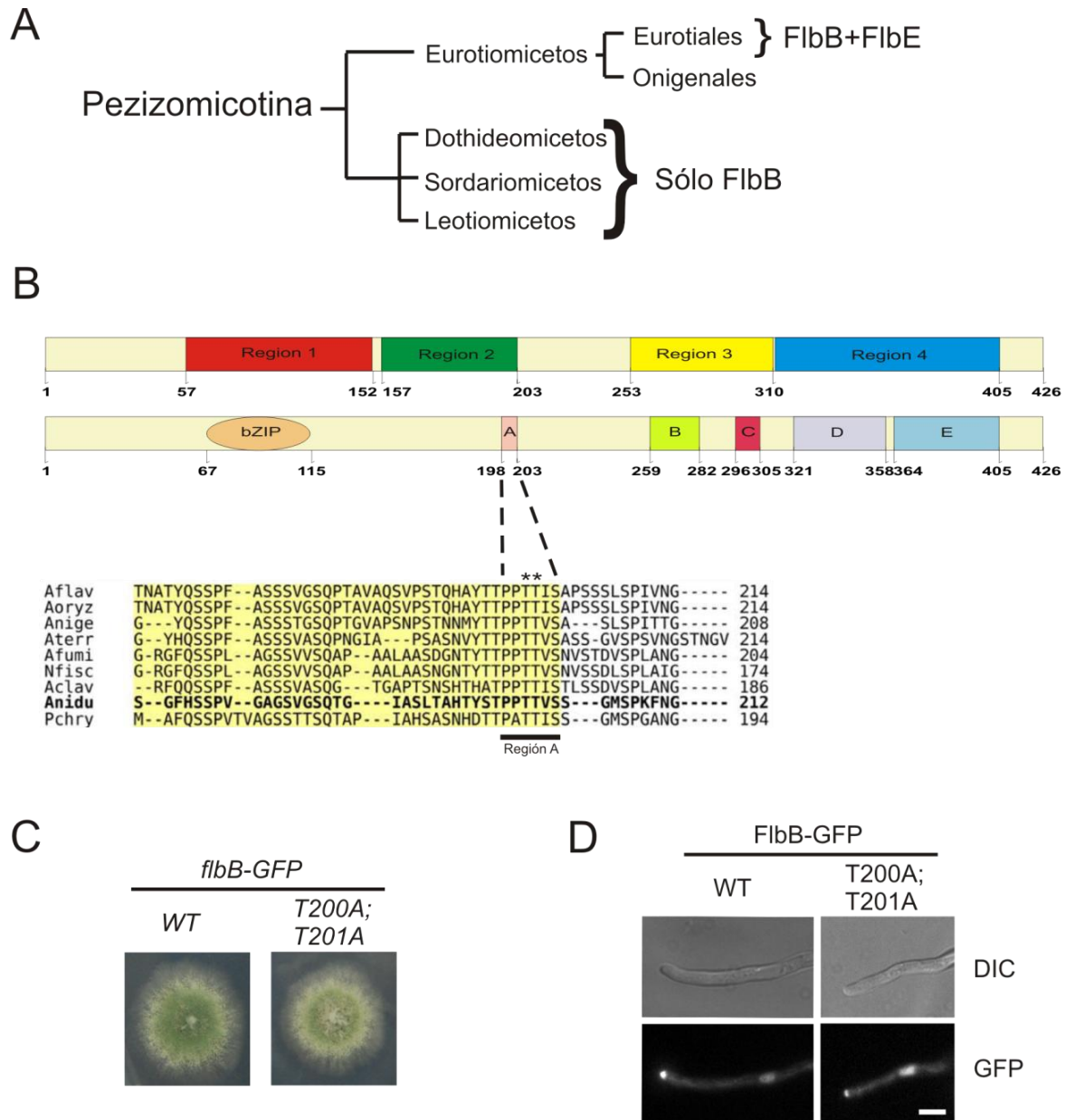
**Fig. R-1: FlbB y FlbE forman el Complejo Apical:** A) Localización celular de FlbB y FlbE etiquetados con GFP. Las puntas de flecha indican la acumulación de fluorescencia de FlbB en la punta de la hifa y el núcleo más apical. En la imagen correspondiente a la célula que expresa FlbE-GFP la flecha indica su acumulación en el ápice. B) En el fondo nulo *flbB*, FlbE pierde su preferente localización apical. De forma similar, la localización celular de FlbB depende de la existencia de FlbE en la célula (la punta de flecha indica el ápice de cada célula). C) La reconstitución de la proteína YFP en la punta de la hifa (imágenes de la izquierda, indicado con una punta de flecha amarilla) demuestra la proximidad física entre la mitad amino terminal de YFP (YFP<sup>N</sup>) fusionada a FlbB y la mitad carboxilo terminal de YFP (YFP<sup>C</sup>) fusionada a FlbE (como se esquematiza a la derecha). La reconstitución de YFP puso en evidencia la formación de un complejo que al menos contiene a FlbB y FlbE. Barra de escala: 10μm.

que incluyeron Dothideomicetos, Sordariomicetos y Leotiomicetos (Cortese *et al.*, 2011) (figura R-2.A). De este modo se definió en el FlbB de *A. nidulans* la región denominada A, que consta de los residuos PPTTVS y que está conservada en los FlbBs de las especies que poseen una proteína similar a FlbE (figura R-2.B). La presencia de estos aminoácidos conservados sugirió su posible implicación en la interacción de FlbB con FlbE. La región A, aa 198-203, contiene dos residuos de treonina que están conservados entre los diferentes homólogos y por tanto identificados como las dianas potenciales para un análisis por mutagénesis dirigida. Para construir las cepas que expresaran formas de FlbB con sustituciones en dichas treoninas se procedió al diseño y generación de un fragmento de

DNA mutante que portaba cambios en 4 nucleótidos que darían lugar al reemplazamiento de los residuos T<sub>200</sub>T<sub>201</sub> por alaninas (T200A; T201A). Utilizando la técnica de PCR de fusión descrita en el apartado 4.1 de M&M, se construyó un casete de DNA para su posterior utilización en la transformación de la cepa adecuada de *A. nidulans*. Este casete contenía la nueva secuencia codificante mutante de *flbB* y las regiones adyacentes que permiten su integración en el locus *flbB*, además del marcador de selección, el gen *pyrG* de *A. fumigatus* (*pyrG<sup>Af</sup>*). Así, se generaron cepas que expresaban esta proteína mutante FlbB<sup>T200A; T201A</sup> etiquetada con la proteína fluorescente verde, GFP, por su extremo amino (N-) terminal, cepa BD591, o carboxilo (C-) terminal, cepa BD589 (ver 4.1 de M&M).

Tomando como ejemplo la construcción que expresa la proteína etiquetada en el extremo C-terminal, el casete correspondiente (ver esquema figura M&M-2.A) se transformó en la cepa *flbB* silvestre (MAD1425) y se seleccionaron cepas recombinantes utilizando el gen *pyrG<sup>Af</sup>* para complementar el marcador auxotrófico *pyrG89* que comúnmente se emplea en estos experimentos. Los transformantes ya evidenciaban en las placas de regeneración un fenotipo de conidiación muy similar al de la cepa silvestre. La purificación y posterior caracterización molecular y análisis fenotípico de algunos de los transformantes confirmó la anterior observación. Tal y como se aprecia en la figura R-2.C la doble sustitución T200A; T201A en FlbB no causó ningún cambio en el desarrollo de estructuras reproductivas asexuales en la cepa BD589 siendo indistinguible su aspecto colonial del de una cepa silvestre. Este resultado fue consistente con el obtenido analizando la cepa BD591 que expresa la proteína mutante FlbB<sup>T200A; T201A</sup> etiquetada en su extremo N-terminal con GFP. En ambos casos, la localización de FlbB<sup>T200A; T201A</sup> fue similar a la observada para FlbB silvestre, es decir acumulación en el ápice y en el núcleo más apical (sólo mostrada la cepa BD589, figura R-2.D). Ante el resultado infructuoso de la aproximación bioinformática nos enfocamos en el análisis de la interacción FlbB-FlbE por métodos bioquímicos.





**Fig. R-2: Análisis funcional de la región A de FlbB como la región directamente involucrada en mediar la interacción con FlbE:** A) Distribución filogenética de los homólogos de FlbB y de FlbE. Se indica en el diagrama las clases del subfilo Pezizomycotina que contienen genes codificantes para ambos Flbs (FlbB+FlbE) o sólo para FlbB (sólo FlbB). Para mayor detalle ver árbol filogenético de la figura 2 de Cortese et al, 2011. B) El análisis comparativo de las secuencias de los factores FlbB en aquellos hongos del orden Eurotiales ayuda a predecir una posible región específica involucrada en la interacción con FlbE. Esquema de la proteína FlbB en el que se delimitan las posibles regiones funcionales definidas mediante dos estudios bioinformáticos. El estudio más exhaustivo señala a la secuencia correspondiente a la región A, que comprende desde el residuo P<sub>198</sub> hasta el S<sub>203</sub>, como la responsable de la interacción FlbB-FlbE. En el alineamiento múltiple: Aflav: *A. flavus*, Aoryz: *A. oryzae*, Anige: *A. niger*, Aterr: *A. terreus*, Afumi: *A. fumigatus*, Nfisc: *N. fischeri*, Aclav: *A. clavatus*, Anidu: *A. nidulans*, Pchry: *Penicillium chrysogenum*. C) La capacidad de conidiación de la cepa que expresa el factor FlbB mutado en la región A, FlbB<sup>T200A;T201A</sup>, es similar a la de una cepa silvestre. D) La proteína mutante FlbB<sup>T200A;T201A</sup>-GFP se localiza en la punta de la hifa y en el núcleo más apical, igual que en la cepa que expresa FlbB-GFP sin modificar. Barra de escala: 5µm.

## 1.2 Abordaje experimental

### 1.2.1 Optimización del ensayo de interacción *in vitro* entre FlbB y FlbE

La posibilidad de detectar una interacción directa entre FlbB y FlbE era elevada dados los resultados de microscopía y análisis genético. Así, se procedió a realizar una serie de experimentos de interacción proteína-proteína mediante la técnica clásica de “pull-down”. Para ello, en primer lugar, se precisó la puesta a punto de este abordaje experimental principalmente en cuanto al diseño y construcción de las herramientas necesarias.

Inicialmente se realizó una aproximación experimental en la que FlbE actuó de cebo y FlbB como presa en el ensayo de “pull-down”. Se generó para ello un plásmido recombinante a partir del comercial pGEX-2T en el que se introdujo el cDNA completo de *flbE* a continuación de la región codificante para el epítipo glutatión-tio-transferasa, GST. Las dianas para las enzimas de restricción incluidas en los oligonucleótidos utilizados para amplificar *flbE* permitieron insertar el fragmento codificante en la fase de lectura correcta para generar la fusión con GST (ver apartado 1.3 de M&M). Esta etiqueta sola o sus fusiones pueden ser purificadas o retenidas gracias a su capacidad de unión a una resina comercial de sefarosa ligada a glutatión reducido (GSH). Se transformó el plásmido recombinante pGEX-FlbE en la cepa *DH1* de *E. coli* y la expresión de la proteína fue inducida añadiendo IPTG a una concentración final de 0.1 mM y siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.4 de M&M. Para extraer la proteína, las bacterias fueron lisadas utilizando una French Press y se comprobó la solubilidad de la proteína, identificando la quimera en el sobrenadante tras una centrifugación a 14000rpm, para evaluar su utilidad en este tipo de experimentos.

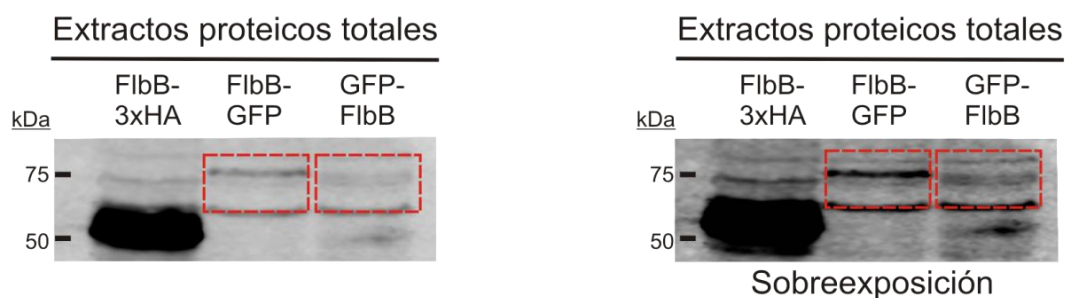
Por otro lado, se elaboró una nueva cepa de *A. nidulans* (BD295) que expresaba la fusión FlbB-3xHA con el fin de mejorar la detección mediante “Western-blot” de FlbB. La extracción de proteínas total de esta cepa se hizo de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 6.1 de M&M. La figura R-3.A demuestra que la detección de la quimera FlbB-3xHA es sustancialmente mejor que la de las fusiones FlbB-GFP (cepa BD167) o GFP-FlbB (cepa BD185). Por ello se utilizó la nueva cepa BD295, *flbB-3xHA*, para los ensayos

posteriores de “pull-down”. De forma estandarizada, los experimentos de interacción proteína-proteína (“pull-down”) se realizaron como se resume brevemente a continuación (esquemmatizado en la figura R-3.B y detallado en la sección 7 de M&M):

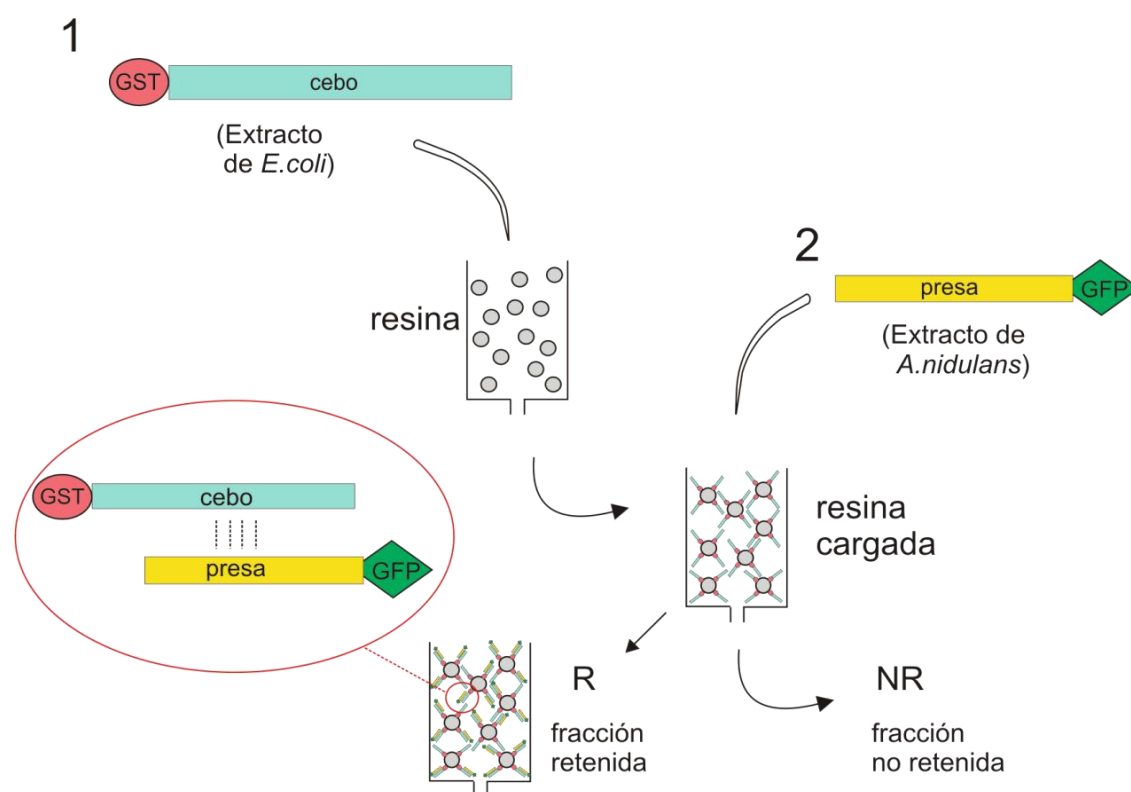
- Se repartió la resina comercial sefarosa-GSH en cada tubo, se lavó y seguidamente se incubó con el extracto de una cepa recombinante *DH1* de *E. coli* en la que se había inducido la expresión de la quimera GST-FlbE.
- En este punto del proceso, se determinó la cantidad apropiada de extracto y su correcta unión a la resina analizando parte de estas muestras en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS, SDS-PAGE.
- Posteriormente, se incubó la resina cargada con la proteína GST-FlbE (“resina cargada”) con el extracto proteico de una cepa de *Aspergillus* que expresaba FlbB-3xHA.
- Tras esta incubación se obtuvo una fracción proteica no retenida (NR) en la resina cargada y una fracción retenida (R). La fracción retenida contendría las proteínas capaces de interaccionar con FlbE en estas condiciones, mientras que las proteínas restantes del extracto estarían incluidas en la fracción no retenida.

Paralelamente como control de la especificidad del experimento de interacción, se utilizó como cebo el extracto de una cepa de *E. coli* que expresaba únicamente el epítipo GST. Parte de las fracciones aisladas se analizó electroforéticamente en dos geles de SDS-PAGE al 10%. Uno de ellos se utilizó para determinar el estado de la muestra mediante tinción con Coomassie y el segundo para el análisis por inmunodetección de las muestras con anticuerpos específicos utilizando la técnica genérica de “Western-blot” (sección 6.2 de M&M). La figura R-4.A muestra la correcta unión entre la resina sefarosa-GSH y la proteína GST (control) o GST-FlbE (ensayo) en las fracciones retenidas (R), mediante la tinción con Coomassie. En ambos casos, las fracciones no retenidas (NR) en la resina cargada muestran el típico patrón de bandas de un extracto de proteínas totales de *A. nidulans*. Los carriles correspondientes a las fracciones retenidas muestran las proteínas GST y GST-FlbE purificadas por unión a la resina.

A



B



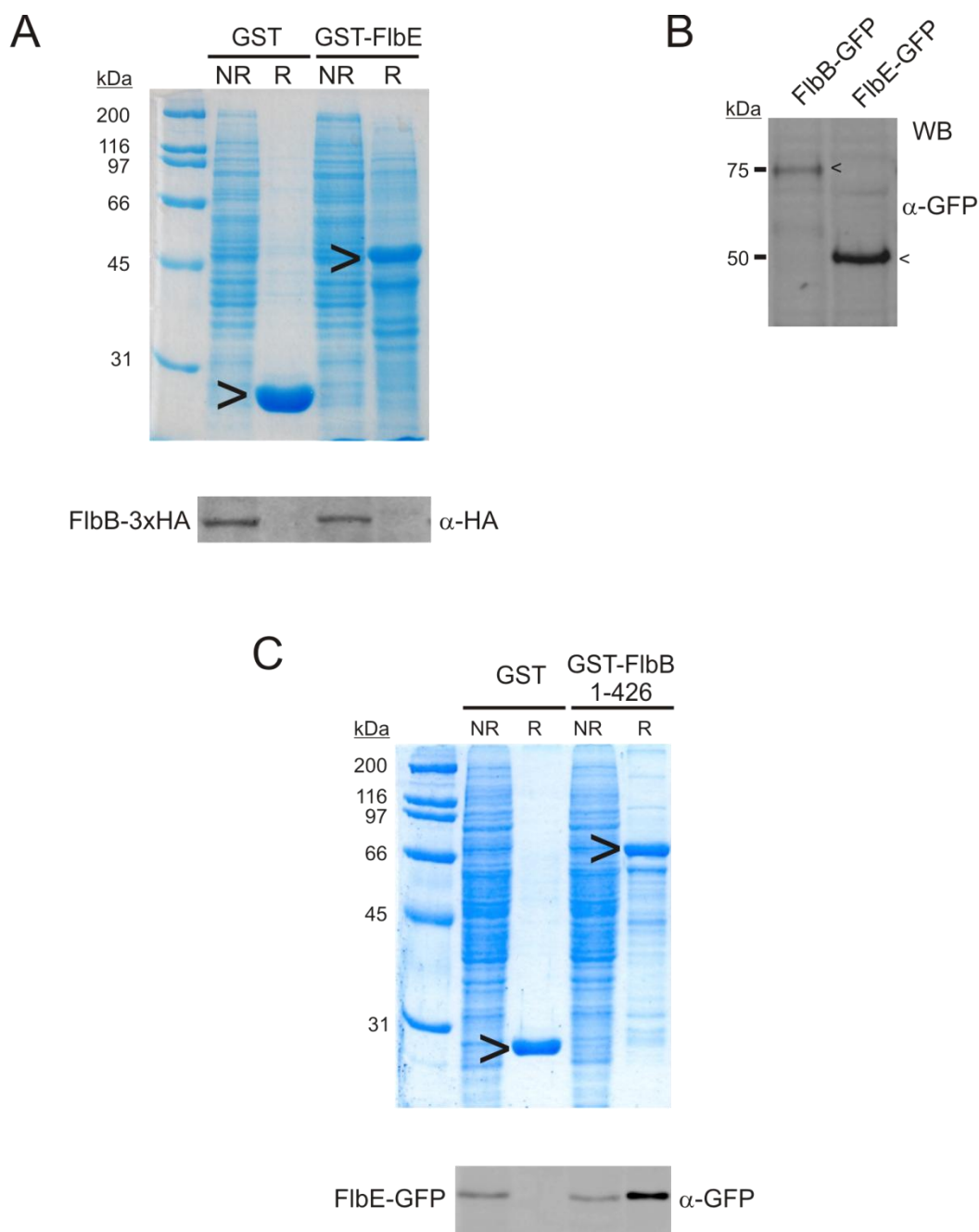
**Fig. R-3: Optimización de los ensayos de “pull-down” utilizando formas etiquetadas de FlbB:** A) La detección de las quimeras FlbB es dependiente del epítipo utilizado. En el “Western-blot” realizado a partir de extractos proteicos totales de las cepas BD295 (*flbB-3xHA*), BD167 (*flbB-GFP*) y BD185 (*GFP-flbB*) se observa que la detección de FlbB etiquetado con el epítipo HA es mejor que con GFP. El recuadro rojo marca la localización de las bandas detectadas con el anticuerpo  $\alpha$ -GFP de las proteínas de fusión FlbB fluorescentes y que requieren de una mayor exposición para ser visualizadas (ver imagen sobreexposición a la derecha). B) Esquema de un ensayo genérico de interacción entre las proteínas FlbB y FlbE mediante la técnica de “pull-down”. En el primer paso (1) el extracto de *E. coli* que contiene la proteína cebo etiquetada con GST es incubado con la resina, obteniéndose la resina cargada. En el segundo paso (2), el extracto proteico total de la cepa de *A. nidulans* que expresa la proteína presa etiquetada se añade a la resina cargada. Tras su incubación, se recogen dos fracciones: la fracción de proteínas retenidas o interactuantes con el cebo (R) y la fracción no retenida (NR).

En el análisis por “*Western-blot*” (figura R-4.A) utilizando un anticuerpo primario anti-HA ( $\alpha$ -HA), no se detecta la proteína FlbB-3xHA en la fracción retenida en la resina cargada con GST-FlbE. Tras diferentes intentos y pequeñas modificaciones al protocolo sin éxito, concluimos que en estas condiciones no somos capaces de visualizar la interacción entre FlbE y FlbB.

Por lo tanto, se decidió ensayar la interacción a la inversa, es decir, utilizando esta vez como cebo a FlbB y siendo la presa FlbE. Para ello, se generó un nuevo plásmido recombinante para producir en *E. coli* la proteína GST-FlbB (ver sección 1.3 de M&M). La nueva fusión GST fue expresada de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 5.4 de M&M. Por otro lado, se obtuvieron extractos proteicos (ver sección 6.1 de M&M) de la cepa de *Aspergillus nidulans* BD186 que expresa a FlbE etiquetada con GFP en su extremo C-terminal (ver tabla M&M-2 de cepas). La detección de la quimera FlbB-GFP mediante “*Western-blot*” es limitada, mientras que FlbE-GFP es fácilmente detectable observándose una banda discreta del tamaño esperado (50kDa) (figura R-4 panel B).

Los ensayos de interacción fueron realizados siguiendo el protocolo descrito en la sección 7 de M&M. En la figura R-4.C se observa la unión a la resina de las quimeras GST o GST-FlbB, mientras que en la parte inferior de la figura se muestra el resultado del análisis por “*Western-blot*” utilizando  $\alpha$ -GFP como anticuerpo primario. Este experimento reveló la presencia de FlbE-GFP entre las proteínas retenidas con la forma GST-FlbB. La especificidad de la interacción quedó verificada por la ausencia de detección de FlbE-GFP en el carril que corresponde a la fracción retenida utilizando resina cargada con GST. Estos experimentos muestran que es posible detectar *in vitro* la interacción entre FlbB y FlbE y por lo tanto recrear la formación del complejo apical que se había detectado previamente en los experimentos *in vivo* con sondas fluorescentes.

Dada la evidente y repetitiva detección de la interacción GST-FlbB/FlbE-GFP, los resultados negativos procedentes del ensayo GST-FlbE/FlbB-3xHA sugieren que la proteína FlbE expresada en *E. coli* no debe ser funcional. Este defecto podría estar causado por la existencia de un plegamiento defectuoso de uno o varios dominios o la ausencia de una posible modificación post-traducciona de FlbE en *Aspergillus*, entre



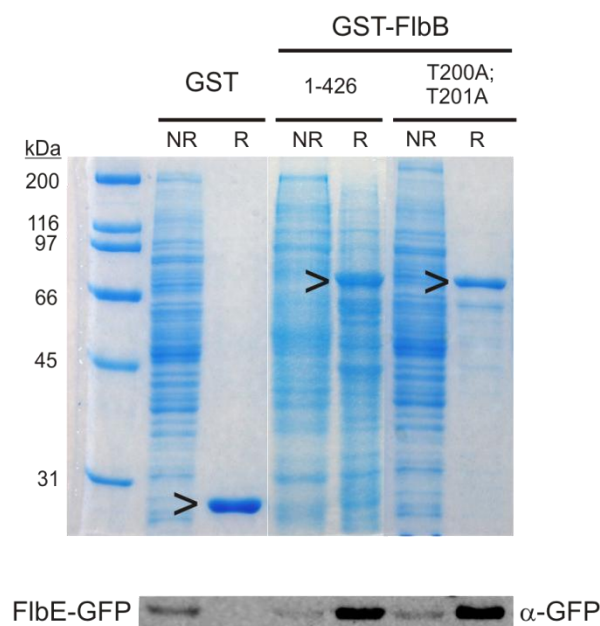
**Fig. R-4: Direccionalidad de la detección de la interacción FlbB-FlbE :** A) Ensayo de “pull-down” entre GST-FlbE y FlbB-3xHA. El gel teñido con Coomassie muestra las fracciones no retenidas (NR) y las fracciones retenidas (R) en la resina tras el ensayo de “pull-down”. Los símbolos (>) indican las bandas correspondientes a los cebos control y problema, GST (26kDa) y GST-FlbE (48kDa), respectivamente. En la fracción retenida con GST-FlbE no se detecta a FlbB-3xHA. B) Detección de la proteína FlbE-GFP (50kDa) frente a FlbB-GFP (74kDa) en extractos proteicos. La mejor detección de la fusión FlbE-GFP permitió su uso en los ensayos de “pull-down”. C) Ensayo de la interacción entre GST-FlbB 1-426 y FlbE-GFP. En el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie se observan las bandas correspondientes a GST (26kDa) y GST-FlbB 1-426 (73kDa), indicadas con el símbolo (>), en las fracciones retenidas (R). En el “Western-blot”, WB, se detecta FlbE-GFP en el carril correspondiente a la fracción retenida con GST-FlbB, demostrando así la existencia de un complejo conteniendo a FlbB y FlbE. En los WB se indican los anticuerpos primarios utilizados:  $\alpha$ -HA y  $\alpha$ -GFP.

otros. Este hecho condicionó la realización de los siguientes experimentos, por lo que se utilizó la interacción detectada entre GST-FlbB/FlbE-GFP como base del estudio de la formación del complejo apical.

### 1.2.2 Influencia de la región A de FlbB, posible región de interacción con FlbE, en la interacción *in vitro*

En primer lugar, como verificación bioquímica de los resultados obtenidos respecto al estudio de la región A de FlbB en el apartado 1.1 de esta misma sección, se procedió a analizar el efecto de la sustitución en FlbB de los residuos de treonina T200A; T201A sobre la interacción con FlbE mediante los ensayos de “*pull-down*”. Para generar el plásmido pGEX-2T correspondiente, se precisó trasladar las sustituciones de nucleótidos necesarias al cDNA de *flbB* tal y como se describe en la construcción del plásmido pGEX-FlbB 1-426 [T200A; T201A] (sección 1.3 de M&M). La expresión de GST-FlbB<sup>T200A;T201A</sup> fue inducida según el protocolo estandarizado (sección 5.4 de M&M) y se ensayó la interacción entre esta proteína de fusión mutante y FlbE-GFP mediante ensayos de “*pull-down*” siguiendo el protocolo descrito en la sección 7 de M&M.

La capacidad de unión a la resina sefarosa-GSH de la fusión GST-FlbB<sup>T200A;T201A</sup> fue similar a la observada para el control positivo del experimento, GST-FlbB 1-426, y el control negativo, GST (imagen SDS-PAGE figura R-5). La detección con anticuerpo  $\alpha$ -GFP de la proteína FlbE-GFP retenida en los diferentes ensayos de “*pull-down*” demuestra que la quimera GST-FlbB<sup>T200A;T201A</sup> es capaz de interaccionar con FlbE (imagen “*Western-blot*” figura R-5). Este resultado demuestra que las mutaciones generadas en la región A de FlbB no impiden la interacción con FlbE, estando de acuerdo con el fenotipo silvestre mostrado por las cepas BD589 y BD591 portadoras de la doble sustitución.



**Fig. R-5: La mutagénesis de la región A de FlbB no impide la interacción con FlbE:** El ensayo de interacción realizado para estudiar el efecto de la mutación en la región A de FlbB muestra las fracciones retenidas (R) y no retenidas (NR) en la resina, teñidas con Coomassie. Se observa la banda correspondiente a GST-FlbB<sup>T200A;T201A</sup> (73kDa) indicada con el símbolo (>), además de los controles negativo y positivo, GST y GST-FlbB respectivamente. En el “Western-blot” realizado utilizando el anticuerpo α-GFP se detecta a FlbE-GFP en la fracción retenida con GST-FlbB<sup>T200A;T201A</sup>, de manera similar a la interacción detectada con GST-FlbB 1-426.

### 1.2.3 Deleción sistemática de las regiones conservadas en FlbB y su efecto sobre la interacción con FlbE

Para profundizar en la caracterización de la formación del complejo apical, el siguiente objetivo fue determinar la región de FlbB implicada en la interacción con FlbE-GFP. A partir de alineamientos múltiples de los posibles homólogos de FlbB de hongos filamentosos utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) (figura I-6 de Introducción), y comparándolos con los análisis bioinformáticos realizados (Cortese *et al.*, 2011), se delimitaron las diferentes regiones conservadas y que potencialmente representarían dominios funcionales en este factor transcripcional. Estos fueron denominados dominio bZIP y regiones A, B, C, D y E, respectivamente (figura R-6.A). De todas estas regiones la función como dominio de unión al DNA de la región que comprende el bZIP, aminoácidos 67-140, ya había sido demostrada (Etxebeste *et al.*, 2009).



Con el fin de determinar la región de FlbB responsable de la interacción con FlbE, se llevó a cabo un análisis mediante la delección seriada de cada una de ellas. Para ello, se diseñaron diferentes truncamientos de FlbB tanto por su extremo N- como C-terminal (figura R-6.A).

La región comprendida entre los aminoácidos 1 al 66 está pobremente conservada entre los diferentes homólogos de FlbB. Así, en primer lugar se determinó si dicha región se precisaba para la interacción con FlbE. Para ello se generó un plásmido que expresaba GST-FlbB 67-426 como se detalla en la sección 1.3 de M&M. El ensayo de interacción entre GST-FlbB 67-426 y FlbE-GFP proporcionó un resultado muy similar al obtenido con la fusión control GST-FlbB 1-426, lo que demostraba que la región 1-66 no se precisa para la interacción FlbB-FlbE (ver figura R-6.B). Con el objetivo de reducir el tamaño de la fusión se decidió continuar este análisis mediante truncamientos utilizando quimeras que comenzaban en el aminoácido 67 y por lo tanto el plásmido que codificaba para GST-FlbB 67-426 fue la base para dicho proceso mutagénico (ver sección 1.3 de M&M).

Así, se generaron las diferentes proteínas de fusión a GST en las que se fueron eliminando sucesivamente las regiones conservadas denominadas E, D, C, B y A, hasta llegar al límite superior del dominio de unión a DNA bZIP, el residuo 140. En la figura R-6.A se esquematiza este diseño experimental. En la tabla R-1 se describen las proteínas generadas a partir de cada truncamiento, citadas con el número de aminoácido de inicio y final de cada proteína.

Tabla R-1: Delección seriada de las regiones conservadas en FlbB

Quimera	Tamaño (kDa)	Regiones presentes en GST-FlbB	Regiones eliminadas de GST-FlbB
GST	26	---	---
GST-FlbB	73	bZIP, A, B, C, D y E	---
GST-FlbB 67-426	65	bZIP, A, B, C, D y E	N terminal (región no conservada)
GST-FlbB 67-361	58	bZIP, A, B, C, D	E
GST-FlbB 67-313	53	bZIP, A, B, C	D y E
GST-FlbB 1-290*	58	bZIP, A, B	C, D y E
GST-FlbB 67-232	44	bZIP, A	B, C, D y E
GST-FlbB 67-169	37	bZIP	A, B, C, D y E
GST-FlbB 67-140	34	bZIP	A, B, C, D y E
GST-FlbB 115-426	60	A, B, C, D y E	bZIP

\*La quimera GST-FlbB 67-290 resultó toxica para *E. coli*, siendo imposible la inducción de la proteína, por lo que se llevó a cabo la construcción de un plásmido que expresaba la quimera GST-FlbB 1-290, la cual fue posible expresar en la bacteria.

Los plásmidos recombinantes se obtuvieron, propagaron y las proteínas de fusión se produjeron siempre en la cepa *DH1* de *E. coli*. La expresión de las diferentes fusiones GST-FlbB fue inducida y los extractos fueron obtenidos tras la lisis de las células bacterianas de acuerdo con el protocolo de la sección 5.4 de M&M. En cada extracto proteico se comprobó la solubilidad de la proteína sobreproducida, siendo el rendimiento producción/solubilidad suficiente en todos los casos para que dichos extractos pudieran ser utilizados en los diferentes experimentos de “pull-down”. En la figura R-6.B los geles de poliacrilamida-SDS teñidos con Coomassie prueban 1) la correcta expresión y tamaño de cada quimera y 2) su capacidad de retención a la resina de sefarosa-GSH y por lo tanto su utilidad en este tipo de ensayos.

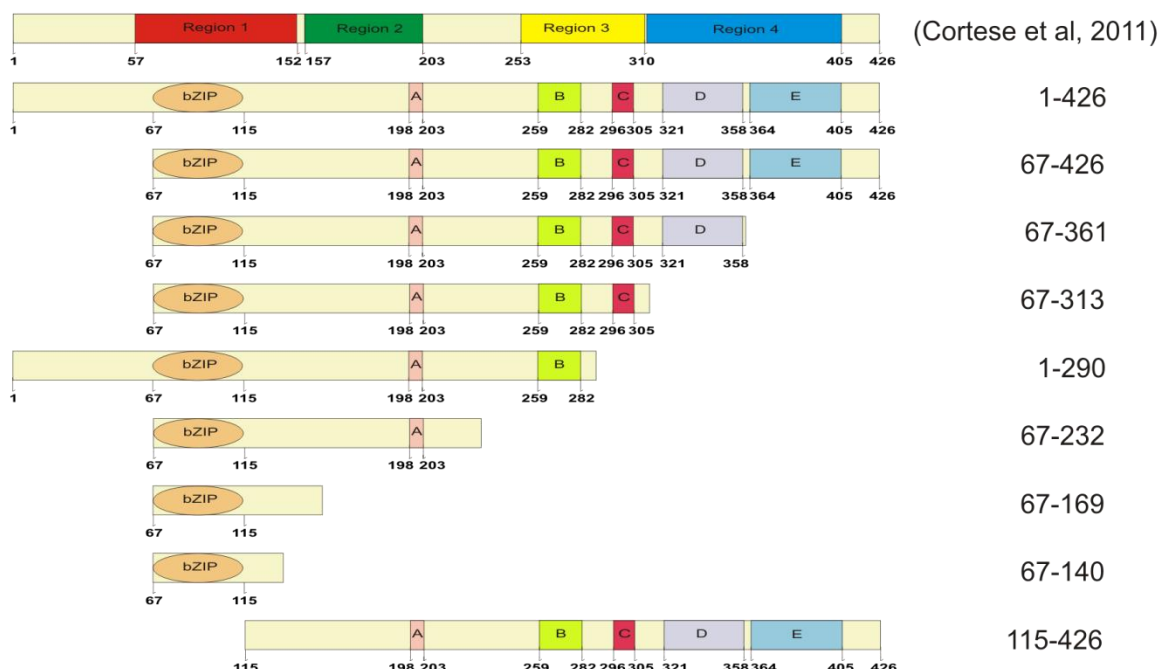
Los ensayos de interacción proteína-proteína se realizaron utilizando como presa la proteína FlbE etiquetada con GFP, procedente de extractos proteicos totales de la cepa de *Aspergillus* BD186. En todos los experimentos de interacciones con las quimeras

truncadas se incluyeron ensayos utilizando muestras con resina cargada con GST o GST-FlbB 1-426, como controles negativo o positivo, respectivamente.

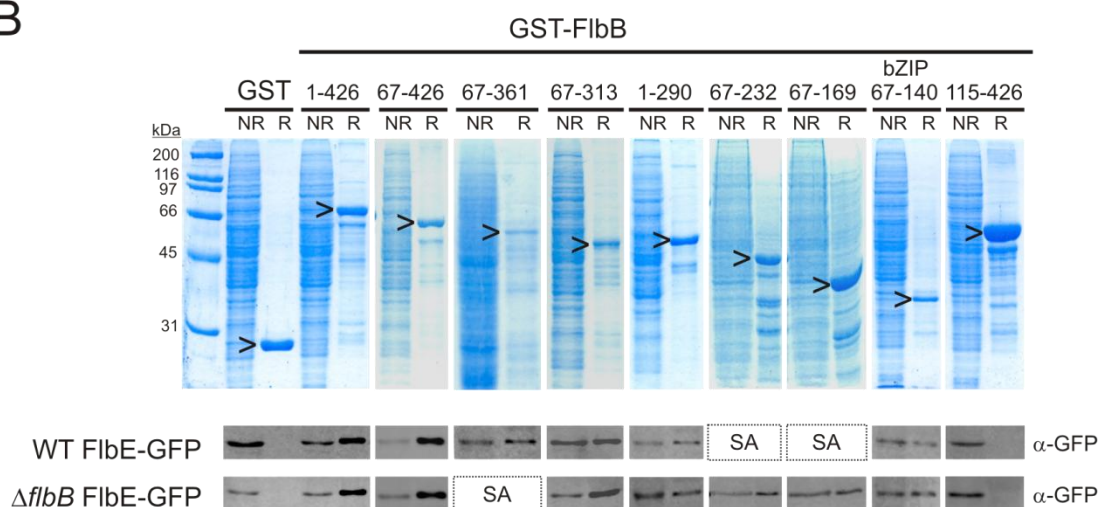
Las proteínas retenidas fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa. A continuación, fueron incubadas con el anticuerpo primario  $\alpha$ -GFP para la detección de la presencia de la proteína FlbE-GFP. En la figura R-6.B se muestran las imágenes de dichos ensayos de “*Western-blot*” en los que se puede observar una banda que corresponde a FlbE-GFP en la fracción retenida cuando se utilizan las quimeras descritas en la tabla. La ausencia de detección de dicha banda cuando se utilizó resina cargada con GST mostraba la especificidad de reconocimiento entre la quimera FlbB truncada y el FlbE-GFP endógeno de *A. nidulans*.

La interacción con FlbE-GFP se detectó en todos los ensayos realizados con cada una de las formas truncadas FlbB, incluso con la forma que sólo comprende el dominio bZIP fusionada a GST, sugiriendo que dicho dominio es suficiente para mediar la interacción entre FlbB y FlbE. Para demostrar la anterior hipótesis se construyó un plásmido recombinante que expresaba la quimera GST-FlbB 115-426. Esta nueva forma truncada de FlbB carece estrictamente de la región que, limitada por su parte inferior en el aminoácido 67, incluye al dominio bZIP. El experimento de “*pull-down*” en la figura R-6.B muestra que no es posible detectar una interacción entre la proteína GST-FlbB 115-426 y FlbE. Por lo tanto, el conjunto de resultados obtenidos tras este análisis de delecciones en FlbB indica que el complejo apical debe formarse al menos a través de la interacción del dominio bZIP de FlbB con FlbE.

A



B

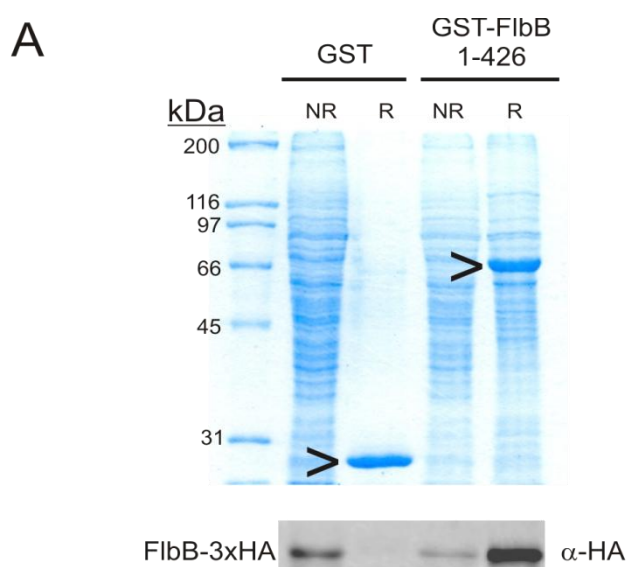


**Fig. R-6: Estudio del papel de las regiones conservadas de FlbB en la interacción con FlbE:** A) Esquema de la distribución de las regiones conservadas en FlbB (ver texto) y de las diferentes construcciones generadas. Se indican las coordenadas de los aminoácidos de inicio y final de cada proteína utilizada en los ensayos. B) Geles teñidos con Coomassie que muestran la unión entre la resina y cada uno de los fragmentos truncados (>) utilizados en cada ensayo de “pull-down”. NR: fracción no retenida, R: fracción retenida. En la parte inferior del panel se muestran los resultados de los ensayos de interacción. La proteína FlbE-GFP se detecta en las fracciones retenidas (R) en todas las fusiones GST-FlbB analizadas con la única excepción de la fusión GST-FlbB 115-426. La interacción de FlbB con FlbE necesita de la región bZIP. Los ensayos se realizaron con extractos proteicos procedentes de fondos genéticos tanto WT como  $\Delta flbB$  en los que se expresaba la proteína FlbE-GFP. SA: Sin analizar.

#### 1.2.4 Demostración de la existencia de interacciones intermoleculares FlbB-FlbB

El tipo de dominio de unión a DNA que posee FlbB es particularmente interesante dado que consta de una cremallera de leucina o “*Zipper*”, lo que inevitablemente sugiere que la funcionalidad de dicho dominio debe estar supeditada a la formación de un homó o heterodímero. Por lo tanto, es razonable pensar que FlbB pueda alternar entre ambos estados de asociación en la célula.

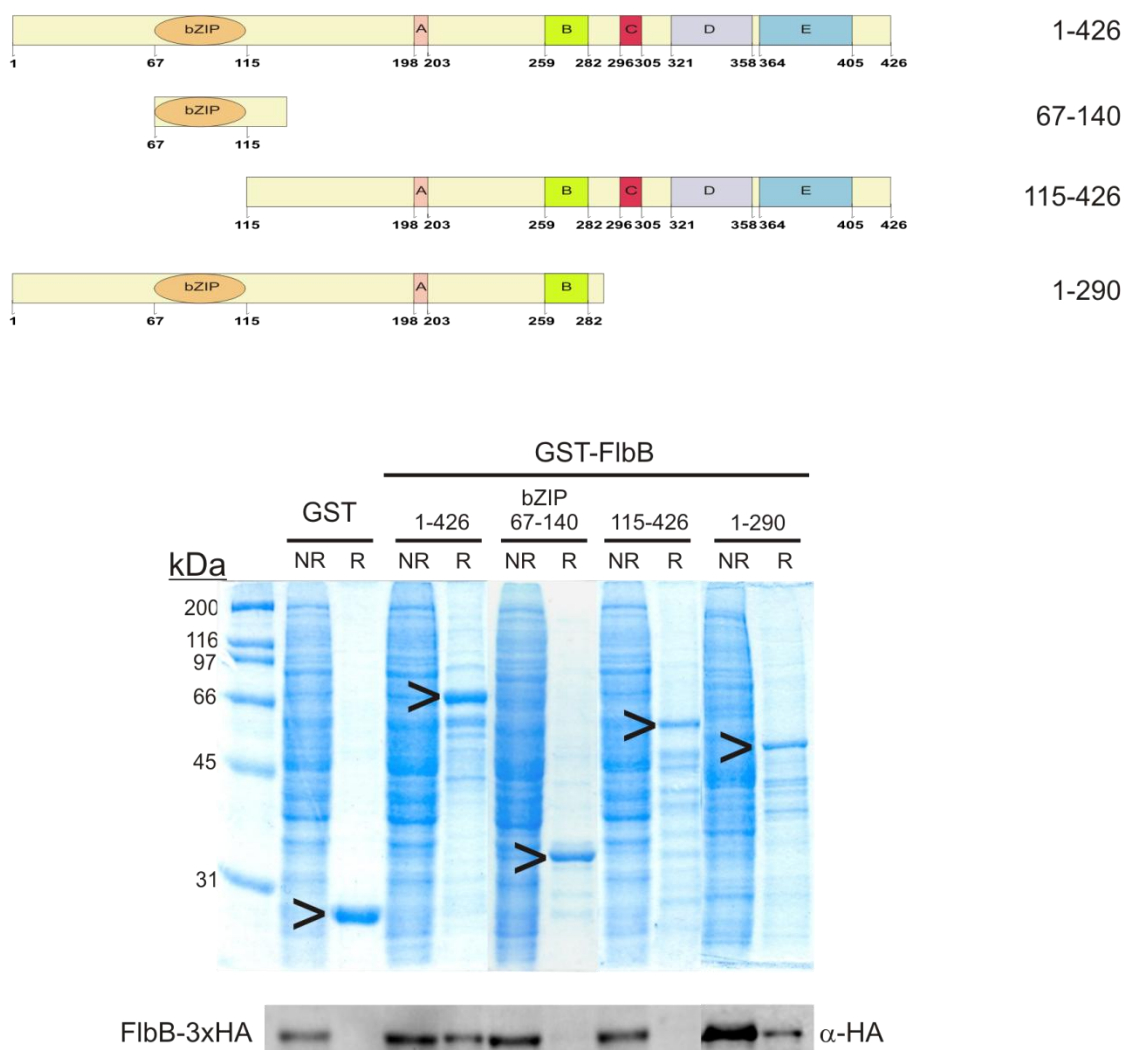
Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de “*pull-down*” utilizando FlbB como cebo y también como presa. Para ello se utilizó, por un lado, el extracto de *E. coli* que expresa la quimera GST-FlbB 1-426 y por el otro, el extracto proteico de *Aspergillus nidulans* de una cepa *flbB-3xHA* (BD295). Se incubaron ambos extractos proteicos siguiendo el protocolo de interacción habitual (sección 7 de M&M) y se analizaron las fracciones retenidas (R) y no retenidas (NR) en geles de poliacrilamida-SDS. Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo de interacción utilizando un extracto de *E. coli* que sólo expresaba GST, como control. Las fracciones retenidas (carriles R en la figura R-7.A) muestran la correcta unión entre la resina de sefarosa-GSH y los extractos que expresan las formas GST y GST-FlbB 1-426 respectivamente. El revelado de las membranas de “*Western-blot*” incubadas con el anticuerpo primario  $\alpha$ -HA mostró una banda de interacción en la fracción retenida utilizando GST-FlbB 1-426, mientras que no se detectó dicha banda en el control de GST. Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad de la proteína GST-FlbB 1-426 de interaccionar con el FlbB endógeno y por lo tanto la existencia de dímeros de FlbB.



**Fig. R-7.A: FlbB es capaz de formar dímeros:** Resultados del “pull-down” en el que se ha utilizado a FlbB como cebo y también como presa. El gel teñido con Coomassie muestra la unión entre la resina y GST o GST-FlbB. En el revelado del “Western-blot” utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -HA se detecta una banda en la fracción retenida (R) en la resina cuando se utiliza como cebo la proteína GST-FlbB. Este resultado queda validado por la ausencia de la banda correspondiente a FlbB-3xHA en la misma fracción para GST.

A continuación, se trató de determinar en mayor detalle la región necesaria para dar lugar a la homodimerización de FlbB. Obviamente, una de las posibilidades consideradas fue que el dominio bZIP fuera suficiente para mediar dicha interacción. Para demostrarlo se ensayaron las quimeras GST-FlbB 67-140, que contiene el dominio bZIP, y GST-FlbB 115-426, que carece del mismo, frente a su posible interacción con la proteína FlbB-3xHA. Sin embargo, como se observa en la imagen del “Western-blot” de la figura R-7.B, no pudo detectarse la interacción de FlbB con ninguna de las dos quimeras citadas. Este resultado sugiere que se precisan además del dominio bZIP otras regiones C-terminales para que se pueda detectar la interacción entre estas quimeras expresadas en bacteria y en el hongo. Para comprobar esta hipótesis se ensayó la quimera GST-FlbB 1-290 frente a FlbB-3xHA. En este caso, sí pudo detectarse interacción (figura R-7.B), sugiriendo que además del dominio bZIP, las regiones A y/o B son necesarias para la homodimerización, mientras que las regiones C, D y E de FlbB resultan prescindibles.

B



**Fig. R-7.B: La formación de heterodímeros GST-FlbB truncados/FlbB-3xHA precisa del bZIP y una región adyacente.** Series de ensayos de “pull-down” utilizando formas de FlbB fusionadas a GST (esquematisadas en la parte superior, coordinadas e identificación de las regiones que contienen como se detalla en la figura R-6). Como control se muestra de nuevo la interacción de FlbB-3xHA con la forma FlbB 1-426, proteína completa. La forma FlbB 1-290 contiene los dominios necesarios para mediar esta interacción con FlbB-3xHA. Sin embargo, la región bZIP, 67-140, o la proteína truncada FlbB 115-426 carecen de toda la información para dicha interacción.

### 1.2.5 Efecto del dominio de dimerización en las interacciones intermoleculares FlbB-FlbB

Las predicciones informáticas realizadas por el Dr. Cortese indicaban que el dominio de dimerización de FlbB podría situarse entre los aminoácidos 101-128. Un análisis más exhaustivo basado en la entropía de Shannon descrita en la introducción, predice que los residuos 104 y 105 de FlbB son los más conservados, por lo que podrían ser esenciales en la interacción intermolecular FlbB-FlbB. Para analizar el papel de ambos residuos en esta interacción, se diseñó una nueva forma mutante en FlbB introduciendo un cambio de 5 nucleótidos en la región codificante que daba lugar al doble cambio L104A; E105A. Dado que se planificó construir dos cepas mutantes, una que expresaría la proteína FlbB<sup>L104A;E105A</sup>-GFP y otra que expresaría la fusión GFP-FlbB<sup>L104A;E105A</sup>, fue preciso utilizar diferentes técnicas de biología molecular. En primer lugar se generó el plásmido pBSK-GFP-FlbB 1-426 [L104A; E105A]-pyroA a partir del mismo plásmido sin mutaciones, de acuerdo con lo establecido en la sección 1.3 de M&M. Para generar la fusión con GFP en el C-terminal, se amplificó FlbB<sup>L104A;E105A</sup> a partir del plásmido citado y utilizando las técnicas de PCR estandarizadas se generó un casete de DNA que codificaba para la fusión FlbB<sup>L104A;E105A</sup>-GFP-PyrG, con el que se reemplazó la región codificante del gen *flbB* nativo dando lugar a la cepa BD409. La cepa BD461 portadora de la fusión con GFP en el extremo N-terminal de la proteína se obtuvo amplificando la región que expresaba GFP-FlbB<sup>L104A;E105A</sup> a partir del plásmido y reemplazando con ella una cepa nula de *flbB* (ver figuras M&M-2.A y B). La selección de transformantes se hizo gracias al efecto del ácido 5-fluoroorótico (5-FOA).

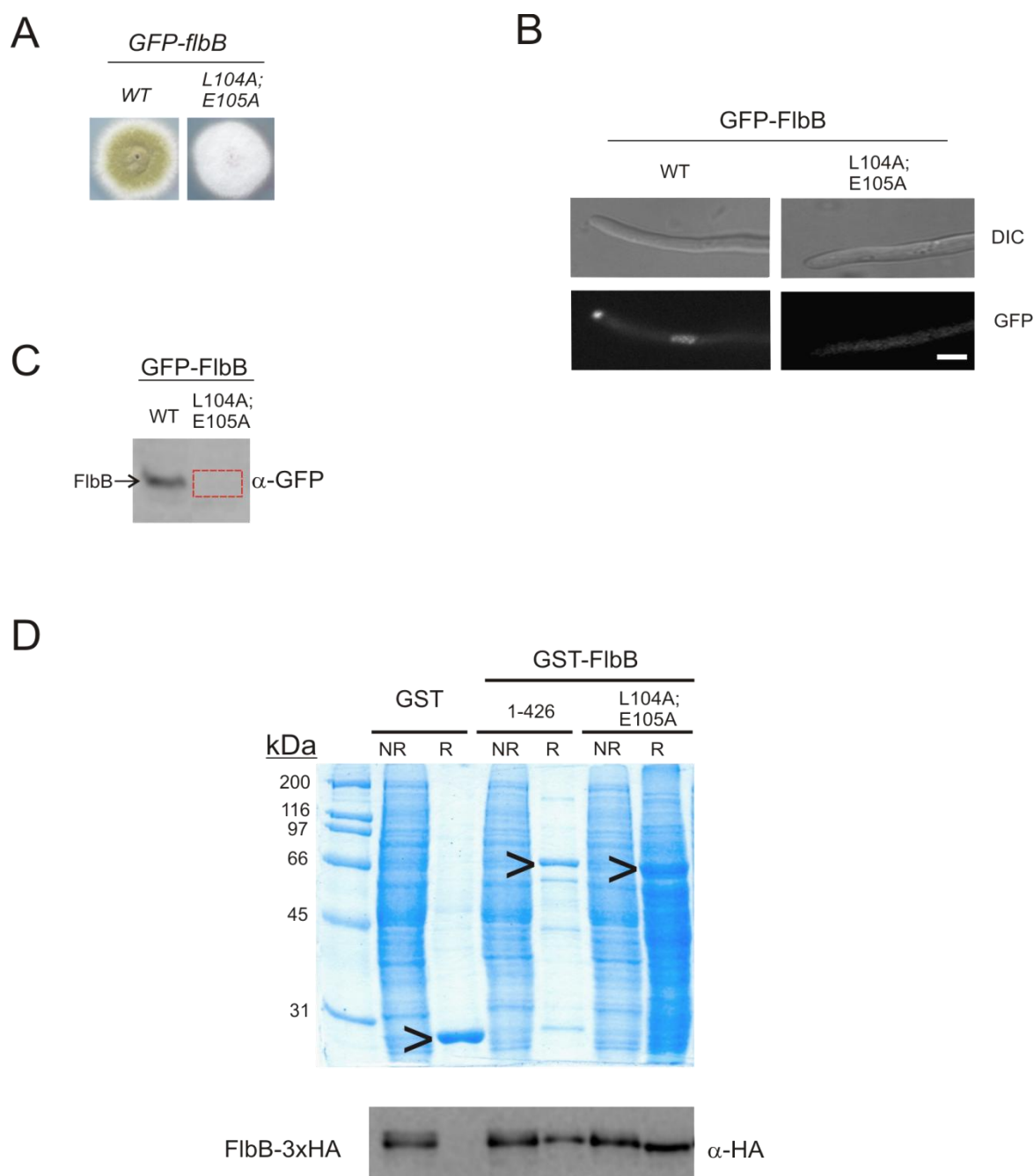
Los resultados obtenidos al analizar fenotípicamente ambas cepas fueron muy similares y en esta memoria se muestran los obtenidos con la cepa BD461 que expresa GFP-FlbB<sup>L104A;E105A</sup>. La cepa BD461 presentó un fenotipo aconidial claramente distinguible del fenotipo conidante de la cepa *GFP-flbB* (figura R-8.A). Este resultado validó la predicción *in silico*, ya que el doble cambio de los residuos L104A; E105A debía estar causando la pérdida de función de FlbB en la ruta UDA.



Se quiso determinar si la doble mutación producía una alteración en la localización celular de FlbB. Sin embargo, el análisis de la localización de la proteína mutante GFP-FlbB<sup>L104A;E105A</sup> por microscopía no fue posible puesto que los niveles de fluorescencia eran demasiado reducidos. La adquisición de imágenes con largos tiempos de exposición, superiores a 1 segundo, no permitieron descubrir la localización de la proteína mutante GFP-FlbB<sup>L104A;E105A</sup> (figura R-8.B), sólo se vislumbró autofluorescencia. Era posible que dicha forma mutante no existiera en la célula o que no fuera fluorescente; para distinguir entre ambas posibilidades se procedió a detectar los niveles de proteína mutante en ensayos de “*Western-blot*”. Nuevamente se obtuvo un resultado negativo dado que no se pudo detectar a la quimera en diferentes extractos proteicos de la cepa BD461 (figura R-8.C). La falta de detección de la proteína tanto por microscopía como mediante “*Western-blot*” fue analizada e interpretada gracias a los experimentos que se realizaron posteriormente dentro del apartado 2.

Determinado el efecto de la mutación en el fenotipo de la cepa que expresa GFP-FlbB<sup>L104A;E105A</sup>, se continuó el análisis de dichas sustituciones en FlbB midiendo su influencia en la homodimerización de este factor transcripcional.

Para ello, el Dr. Etxebeste generó un plásmido que expresaría en bacteria la fusión GST-FlbB<sup>L104A;E105A</sup>. Siguiendo la metodología ya establecida, una vez producida la proteína de fusión se realizó un experimento de interacción *in vitro* frente a la proteína FlbB-3xHA producida en *A. nidulans*. Las fracciones obtenidas se analizaron en un gel de poliacrilamida-SDS y éste se tiñó con Coomassie para comprobar la correcta unión entre la resina y la fusión GST-FlbB<sup>L104A;E105A</sup> (figura R-8.D). Tras el revelado del “*Western-blot*” utilizando anticuerpo  $\alpha$ -HA se detectó una banda de interacción correspondiente a la proteína FlbB-3xHA en la fracción retenida cuando se utilizó la proteína mutada en la supuesta región de dimerización de FlbB (figura R-8.D). Este resultado pone de manifiesto que la mutación FlbB<sup>L104A;E105A</sup> no afecta a la dimerización FlbB-FlbB, a pesar de provocar una pérdida de función en la cepa portadora de la doble sustitución.



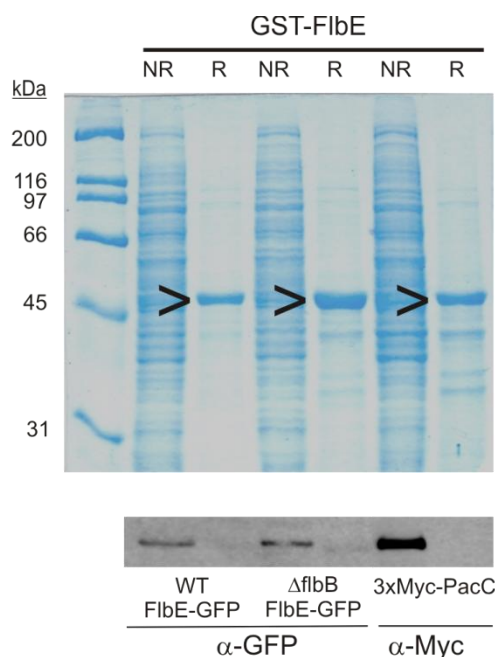
**Fig. R-8: Estudio de la función de los residuos L104 y E105 pertenecientes al dominio bZIP y su implicación en la dimerización de FlbB:** A) La cepa que expresa una fusión GFP-FlbB que porta las sustituciones L104A; E105A presenta un fenotipo aconidial. B) La fluorescencia emitida por la proteína mutante es indetectable, por lo que no fue posible determinar su localización en la célula. Barra de escala: 5  $\mu$ m. C) Los niveles de expresión de la proteína mutante GFP-FlbB<sup>L104A; E105A</sup> son muy reducidos. D) Tras un ensayo de interacción proteína-proteína el gel teñido con Coomassie muestra la unión entre la resina y las fusiones de GST. En el “Western-blot” se observa una banda de interacción en la fracción retenida (R) en la resina cuando utilizamos la quimera GST-FlbB<sup>L104A; E105A</sup>, similar a la detectada para la proteína sin mutaciones. Esto indica que la doble sustitución de los residuos L 104A ; E105A no impide la dimerización de FlbB.

### 1.2.6 La interacción de GST-FlbB con FlbE-GFP no está mediada por el FlbB endógeno

El conjunto de resultados obtenidos en los apartados previos planteaba la posibilidad de que la propia homodimerización de FlbB estuviera mediando la interacción entre FlbB y FlbE. La interacción detectada *in vitro* entre GST-FlbB y FlbE-GFP, descrita en el apartado 1.2.1, podría deberse al FlbB endógeno o incluso a la formación de otros complejos a través del propio FlbE.

Primeramente, se analizó si FlbE era también capaz de interaccionar *in vitro* consigo mismo. Todas las herramientas genéticas y moleculares para realizar este experimento estaban ya disponibles, por lo que no se precisó de ninguna construcción adicional. Se utilizó la quimera GST-FlbE como cebo en los experimentos de “*pull-down*” y se enfrentó a extractos de *Aspergillus* de cepas que expresaban FlbE-GFP en el fondo *flbB* silvestre (BD186) o en fondo nulo de *flbB* (BD187). La figura R-9 muestra el resultado de este experimento. La tinción con Coomassie sirve de control de interacción con la resina y de “*pull-down*”. La inmunodetección con anticuerpo  $\alpha$ -GFP detectó la proteína FlbE-GFP sólo en los carriles donde se había resuelto la fracción no retenida del experimento. Por tanto, se asumió que FlbE no debe interaccionar consigo mismo, al menos, en estas condiciones. Así, no podemos distinguir entre la ausencia de la formación de dímeros de FlbE y la existencia de problemas asociados con la expresión del cebo en bacteria, tal y como hemos hipotetizado en secciones anteriores.

Una vez descartada la formación de un complejo entre proteínas FlbE que en estas condiciones pudieran estar implicadas en la interacción GST-FlbB/FlbE-GFP, el trabajo se enfocó en detectar un posible efecto de la homodimerización de FlbB en dicha interacción *in vitro*.



**Fig R-9: Ausencia de evidencia de la dimerización de FlbE:** Se realizaron ensayos de “pull-down” con extractos proteicos de cepas que expresan la fusión FlbE-GFP en presencia o ausencia de FlbB. El cebo de los ensayos fue GST-FlbE (48 kDa) unido a la resina de glutation-sefarosa. La imagen del gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie muestra las diferentes fracciones rescatadas. En la parte inferior se presenta el resultado de la inmunodetección de la forma FlbE-GFP en las anteriores fracciones en el que se aprecia la escasa o nula retención de la fusión fluorescente por el cebo. Como control negativo del experimento se utilizó un extracto de una cepa de *Aspergillus* que expresaba la fusión Myc-PacC , disponible en el laboratorio.

Para estudiar la mediación del FlbB endógeno en la interacción entre GST-FlbB y FlbE-GFP, se diseñó una nueva serie de experimentos de “pull-down” en los que se utilizaron nuevamente como cebo las quimeras descritas en la tabla R-1, y como presa la proteína FlbE-GFP expresada en un fondo genético nulo de *flbB*. Este experimento pudo llevarse a cabo dado que los niveles de FlbE-GFP no se ven modificados por la ausencia o presencia de FlbB en la célula fúngica (Garzia *et al.*, 2009). Se realizaron, por tanto, nuevos ensayos de “pull-down” utilizando extractos proteicos de la cepa BD187,  $\Delta flbB$  *flbE-GFP* y se obtuvieron los resultados mostrados en la parte inferior de la figura R-6.B. Los experimentos de interacción proteína-proteína mostrados revelan que no existe ninguna diferencia entre el uso de una cepa que expresa FlbE-GFP en un fondo silvestre y la que lo expresa en un fondo  $\Delta flbB$ , manteniéndose en ambos casos las mismas interacciones y a un nivel similar. Por lo tanto, la interacción detectada entre FlbB y FlbE es independiente del FlbB endógeno.

## **2.- Regulación transcripcional de FlbB: Evidencia de la autorregulación de la transcripción de *flbB***

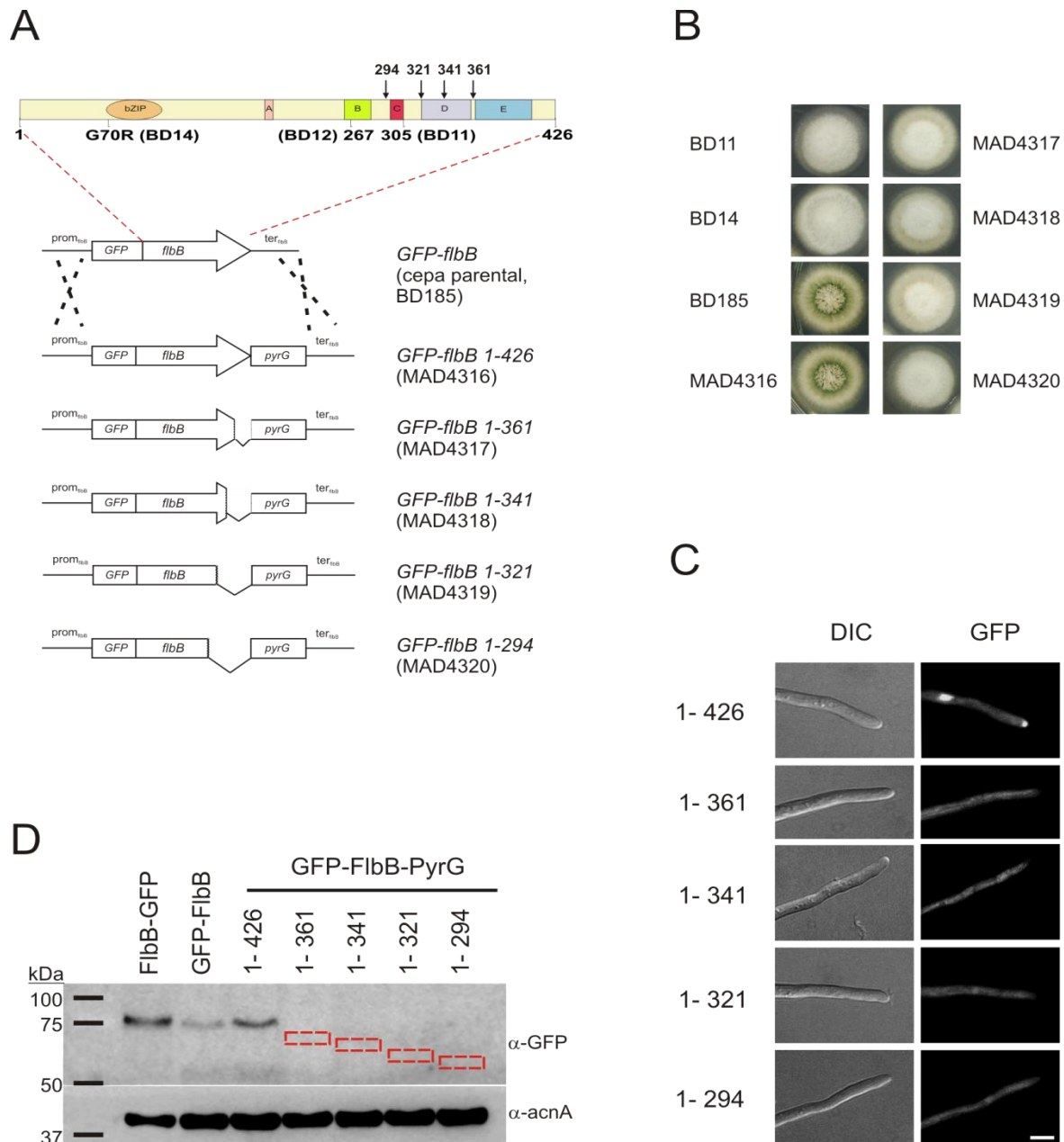
### **2.1 Truncamientos en el extremo C-terminal reducen los niveles de FlbB**

El hecho de que el dominio de unión a DNA bZIP de FlbB sea la región involucrada en la interacción con FlbE contrasta con el análisis de los mutantes aislados y caracterizados inicialmente en el gen *flbB* y que resultaban en sendos truncamientos de regiones localizadas en el extremo C-terminal, como por ejemplo los mutantes BD11 y BD12 (Etxebeste *et al.*, 2008; Etxebeste, 2008). Para estudiar el papel de la región C-terminal en la función de FlbB y la formación del complejo apical se procedió a un análisis más exhaustivo del mutante BD11.

La cepa BD11 es portadora del alelo mutante *flbB102* (Etxebeste *et al.*, 2008) y con ella se dio comienzo a la revisión genética y funcional de la ruta UDA. Esta cepa BD11 porta dos mutaciones en la región codificante de *flbB*, la sustitución C1255T y la delección C1257Δ. Estas mutaciones dan lugar al reemplazo del residuo P305 por una leucina (P305L) y a un cambio en la fase de lectura, a partir del triplete que codifica para P305L, por el que se insertan otros 36 aminoácidos fuera de fase hasta el codón stop más próximo. La proteína generada por el alelo *flbB102* carece de las regiones D y E que son las más cercanas al extremo carboxilo terminal. Este truncamiento en FlbB da lugar a un fenotipo aconidial o *fluffy*, lo que indica que una o ambas regiones eliminadas son necesarias para la funcionalidad de FlbB. Con el objetivo de descubrir cuál de ellas era la responsable del cambio fenotípico, se diseñaron nuevas formas alélicas de FlbB mediante truncamientos que eliminaban secuencialmente la región E y la región D, sustituyendo los codones de los residuos Y361 y K321 por codones stop, respectivamente. Como la región D incluye dos subregiones muy conservadas, se diseñó otro truncamiento, V341stop, dividiendo ambas zonas. Adicionalmente, dado que en BD11 se modifica el residuo 305 y éste se encuentra al final de la región conservada C, se diseñó una nueva forma truncada que eliminaba dicha región. Para ello, se sustituyó el codón del residuo F294 por un codón stop (ver figura R-10.A).

La estrategia elegida fue la de generar cepas mutantes mediante genética en reverso donde se reemplazaba la secuencia codificante de *flbB* por la de los nuevos alelos mutantes producidos. Las mutaciones que causaban los truncamientos fueron generadas por PCR con oligonucleótidos específicos (ver tabla oligonucleótidos en la sección 1.2 de M&M) usando como molde DNA genómico de una cepa que expresa GFP-FlbB (BD185). Estos fragmentos se fusionaron al marcador de selección *pyrG<sup>Af</sup>* por PCR de fusión y cada uno de los casetes fue utilizado para la transformación de la cepa BD185, que mediante recombinación homóloga, tal y como se representa en la figura R-10.A, dieron lugar a los diferentes alelos mutantes. Las cepas recombinantes fueron analizadas por “*Southern-blot*” para verificar la correcta inserción del casete. De las cepas seleccionadas (ver código MAD en figura R-10.A) se procedió al análisis del fenotipo de conidiación y a determinar tanto la localización celular como los niveles de proteína mutante fluorescente FlbB.

En los análisis cualitativos del fenotipo de cada cepa se observó que la delección de un fragmento de la proteína causó una reducción notable en la capacidad de conidiación, tomando como referencia a la cepa que expresa la proteína completa (figura R-10.B). El análisis microscópico permitió determinar que la localización de la quimera GFP-FlbB 1-426, la proteína completa, era indistinguible entre la cepa receptora BD185 y la cepa MAD4316 (comparar figuras R-8.B y R-10.C). Sin embargo, al tratar de determinar la localización de las quimeras truncadas se observó que los niveles de fluorescencia eran muy reducidos y en ningún caso se pudo observar acumulación fluorescente en la punta o dentro de los núcleos. Este hecho sugirió que dichas quimeras no se estaban expresando o que sus niveles eran muy bajos. Este último supuesto quedó demostrado, según se observa en la figura R-10.D, al no detectarse con anticuerpo  $\alpha$ -GFP ninguna de las quimeras truncadas, incluso tras largos tiempos de exposición del “*Western-blot*”.



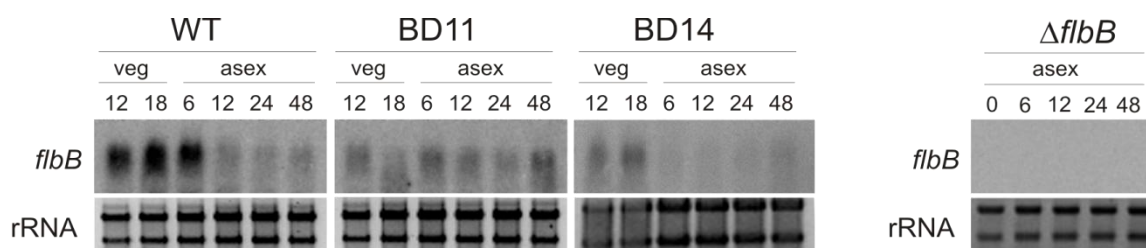
**Fig. R-10: El truncamiento de FlbB da lugar a bajos niveles de este factor y a un fenotipo aconidial:** A) Diagrama que resume el proceso de construcción de las cepas que expresan las formas truncadas de FlbB en su extremo C-terminal. Los diferentes casetes de DNA fueron utilizados en la transformación de la cepa receptora BD185 que expresa GFP-FlbB .B) Comparativa de los fenotipos que muestran las colonias de las nuevas cepas mutantes frente a las cepas aconidiales control (BD11 y BD14, cuyas mutaciones en FlbB se indican en el panel A) y la cepa receptora de las construcciones BD185 tras 48h de incubación a 37°C. C) Imágenes que ilustran la ausencia de fluorescencia en las células de las diferentes cepa mutantes generadas, lo que no permite determinar la localización celular de las proteínas truncadas. La cepa MAD4316 que expresa la forma control GFP-FlbB 1-426, de acuerdo con resultados previos, muestra una localización típica de FlbB. Barra de escala: 5µm. D) Las proteínas truncadas no fueron detectadas por “Western-blot”. El recuadro rojo indica la posición esperada para cada una de las bandas correspondientes a las proteínas truncadas, siendo el peso molecular estimado para éstas, de menor a mayor tamaño de la delección, de 67, 64, 62 y 59kDa respectivamente. Se utilizaron los niveles de actina (α-acnA) como control de carga.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de que los niveles del transcrito de *flbB* en estos fondos genéticos estuviesen afectados. Para verificarlo se procedió a estudiar mediante “Northern-blot” los niveles de expresión de dos alelos mutantes clásicos en *flbB*, el anteriormente citado *flbB102* y también el *flbB100*. Se extrajo RNA total, según el protocolo descrito en la sección 4.3 de M&M, a partir de micelio vegetativo y en proceso de diferenciación celular del mutante BD11 (*flbB102*), así como de otro mutante clásico de *flbB* previamente descrito (Etxebeste *et al.*, 2008), el BD14 (*flbB100*). La cepa BD14 porta la sustitución G456A en la región codificante de *flbB*, causando el cambio puntual de la glicina 70 por un residuo de arginina, G70R. Ambas cepas son aconidiales, por lo que muestran una pérdida de función de FlbB.

La figura R-11 muestra los niveles estacionarios del transcrito de *flbB* de las cepas WT (FGSC26), BD11 y BD14. El RNA total de cada cepa se extrajo a diferentes tiempos: t= 12h y 18h de crecimiento vegetativo y t= 6h, 12h, 24h y 48h después de la inducción del desarrollo asexual (donde t=18h de crecimiento vegetativo es igual a t=0 del desarrollo asexual). Tras la hibridación con la sonda específica para *flbB*, comprobada por la ausencia de detección de transcrito en la cepa  $\Delta flbB$  (BD143) (panel derecho de la figura R-11), se observa una notable reducción en los niveles de expresión de *flbB* durante el crecimiento vegetativo en las cepas BD11 y BD14 en comparación con los de *flbB* en la cepa silvestre. En la cepa BD14 también se ven reducidos los niveles de transcrito durante el desarrollo asexual.

Estos resultados sugieren que las mutaciones aisladas o generadas en *flbB* pueden estar modificando su patrón de expresión, afectando quizás a un posible mecanismo de autorregulación transcripcional.





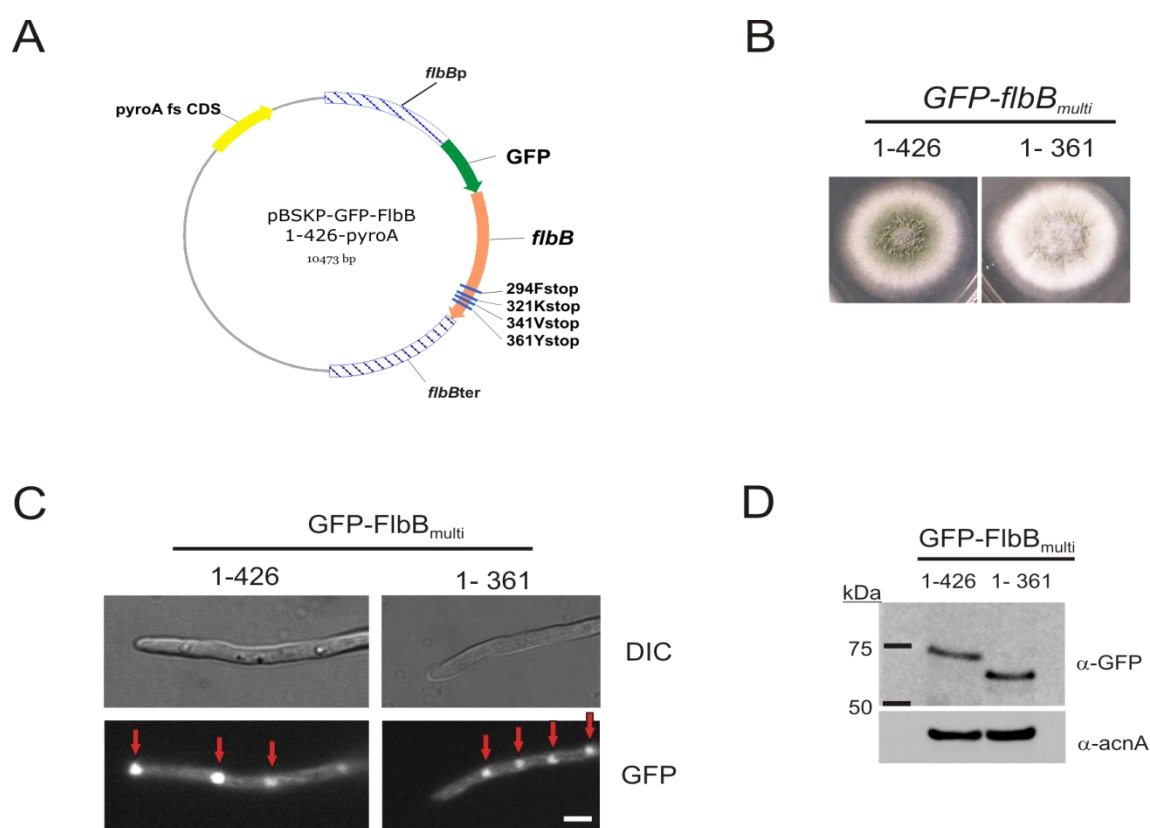
**Fig R-11: Mutaciones puntuales en FlbB reducen los niveles de su transcrito:** Detección del transcrito *flbB* en las cepas mutantes BD11 y BD14, respecto a la cepa silvestre (WT, cepa FGSC26). Comparativamente, la expresión de *flbB* está reducida en las células vegetativas (veg) y en el caso del mutante BD14, también en las células en desarrollo asexual (asex). En la parte superior de las imágenes se indica el tiempo de cultivo o inducción de la conidiación en el que se extrae el RNA total de la muestra de micelio correspondiente. A pesar de la reducción en los niveles de transcrito éste se detecta cuando se compara con el fondo de hibridación utilizando RNA total procedente de una cepa nula *flbB*, imagen de la derecha. Se muestra la tinción con BrEt del rRNA como control de carga en cada carril del “Northern-blot”.

## 2.2 Múltiples copias de FlbB permiten visualizar a la proteína mutante FlbB 1-361

Una demostración adicional que sugería la posible autorregulación de *flbB* se obtuvo cuando se analizaron cepas que habían sido previamente diseñadas para el estudio funcional de las regiones conservadas de FlbB. Estas nuevas cepas se habían construido insertando en el locus *pyroA* de la cepa BD177 ( $\Delta flbB$ -*riboB*<sup>Af</sup>) una serie de plásmidos denominados pBSKP-GFP-FlbB 1-x -*pyroA*, donde x corresponde a la coordenada donde se introduce una parada en la traducción del factor transcripcional (ver sección 1.3 de M&M y figura R-12.A). En estas cepas deberían estar produciéndose las proteínas de fusión GFP-FlbB terminando en los aminoácidos 361, 341, 321 y 294 de FlbB, así como la forma completa hasta el aminoácido 426.

La cepa que expresaba la proteína completa (MAD4314) no mostró defectos en su capacidad de conidiar. Sin embargo, las diferentes cepas obtenidas tras la transformación que debían expresar cada una de las formas truncadas de FlbB, mostraron un fenotipo aconidial (ejemplificado para la cepa que expresa GFP-FlbB 1-361, figura R-12.B). Al examinar las diferentes cepas con el microscopio de fluorescencia para determinar la localización celular de las proteínas de fusión mutantes, sólo pudo detectarse fluorescencia en uno de los transformantes que debía producir la forma GFP-FlbB 1-361, la cepa MAD4315. Dicha cepa mostraba el fenotipo aconidial antes descrito (figura R-

12.B). La observación al microscopio nos permitió determinar que dicha proteína se acumulaba en los diferentes núcleos del sincitio, por lo que se había perdido la localización preferentemente apical, como muestra la imagen de la cepa que expresa la forma GFP-FlbB completa (figura R-12.C). Para un mejor análisis comparativo se utilizó la cepa que poseía múltiples copias (tres) del plásmido pBSKP-GFP-FlbB 1-426-pyroA dado que la cepa MAD4315 seleccionada poseía múltiples copias (>3 integraciones) del plásmido pBSKP-GFP-FlbB 1-361-pyroA.



**Fig. R-12: Múltiples copias permiten visualizar a la proteína FlbB truncada:** A) Plásmido en el que se insertaron los diferentes casetes de DNA que expresan a la fusión GFP-FlbB en sus versiones completa y truncadas. Cada plásmido derivado fue utilizado para transformar una cepa nula de *flbB* de *A. nidulans*. B) Las cepas que expresaban formas truncadas de GFP-FlbB mostraron un fenotipo aconidial frente a la profusa esporulación de la cepa que expresaba la proteína completa. En la imagen se ilustra la cepa mutante que expresa FlbB 1-361 a partir de más de dos copias del plásmido integrado en el locus *pyroA*. C) La elevación en los niveles de proteína producidos por la integración múltiple del plásmido permite visualizar la localización celular de la proteína truncada FlbB 1-361. Las flechas rojas indican que esta forma mutante de FlbB está acumulándose en los diferentes núcleos del compartimento celular aunque está ausente de la punta de la célula. Barra de escala: 5  $\mu$ m. D) Las múltiples copias de FlbB 1-361 permiten la detección de la proteína por “Western-blot”. Se detecta la proteína GFP-FlbB 1-361 con un peso molecular aproximado de 67kDa, cuyos niveles son similares a los detectados para la proteína completa GFP-FlbB 1-426, peso estimado de 74kDa, en una cepa multicopia. Se utilizaron los niveles de la actina ( $\alpha$ -acnA) como control de carga.

Esta pérdida de localización en la punta de la hifa en la cepa portadora del truncamiento de FlbB fue analizada posteriormente (ver apartado 3) y ya sugería que la función de FlbB debía estar alterada al no poder adquirir esta localización celular. Así, la posibilidad de detectar esta forma mutante parecía depender del incremento de sus niveles intracelulares al introducirse múltiples copias del transgen (figura R-12.D). Dado que este transgen está bajo el control del propio promotor de *flbB*, este resultado sugería que la falta de función en FlbB debería estar afectando a la expresión de este promotor y que dicho efecto sería parcialmente suprimido al integrarse un elevado número de copias de la construcción. Este resultado por tanto, sustentaría la posible autorregulación de la expresión de FlbB.

### 2.3 Mutagénesis dirigida de la metionina iniciadora de FlbB

Para obtener más evidencia de la autorregulación de *flbB*, se decidió generar un alelo mutante en el que el codón que codifica para la metionina iniciadora fuera modificado a ATC, que codifica para una isoleucina. De esta forma se produciría un alelo nulo pero debería ser posible estudiar sus niveles de transcripción. Se eligió esta estrategia dado que en el laboratorio se han estudiado mutantes similares, como por ejemplo el mutante Met5Ile en PacC o VeA1 (Mingot *et al.*, 1999; Stinnett *et al.*, 2007).

El nuevo alelo mutante se generó utilizando las técnicas ya mencionadas con anterioridad en este trabajo y que se resumen en el panel A de la figura R-13, utilizando oligonucleótidos específicos. La correcta inserción del casete de DNA en los transformantes obtenidos fue verificada por “Southern-blot” y a continuación se analizaron en detalle.

El fenotipo de una cepa portadora del alelo *flbB*<sup>M1I</sup> (metionina 1 isoleucina), BD381, es aconidial como se observa en la figura R-13.B. La cepa *flbB*<sup>M1I</sup> exhibe un fenotipo *fluffy* similar al de una cepa nula, por lo que se concluye que esta mutación puntual da lugar a un fenotipo de pérdida total de la función de FlbB. A continuación, se realizó el análisis comparativo de los niveles estacionarios del mRNA de FlbB entre las dos

cepas control, la WT (MAD2666) y la que tiene insertado en el locus *flbB*, tras la región codificante, al marcador de selección *pyrG<sup>Af</sup>* (BD382), frente a la cepa *flbB<sup>M11</sup>*. La figura R-13.C muestra la expresión de *flbB* a las 18h de crecimiento vegetativo que es el t=0 de la inducción del desarrollo asexual y a las 6h, 12h, 24h y 48h del desarrollo asexual en muestras de RNA totales de las cepas anteriormente citadas.

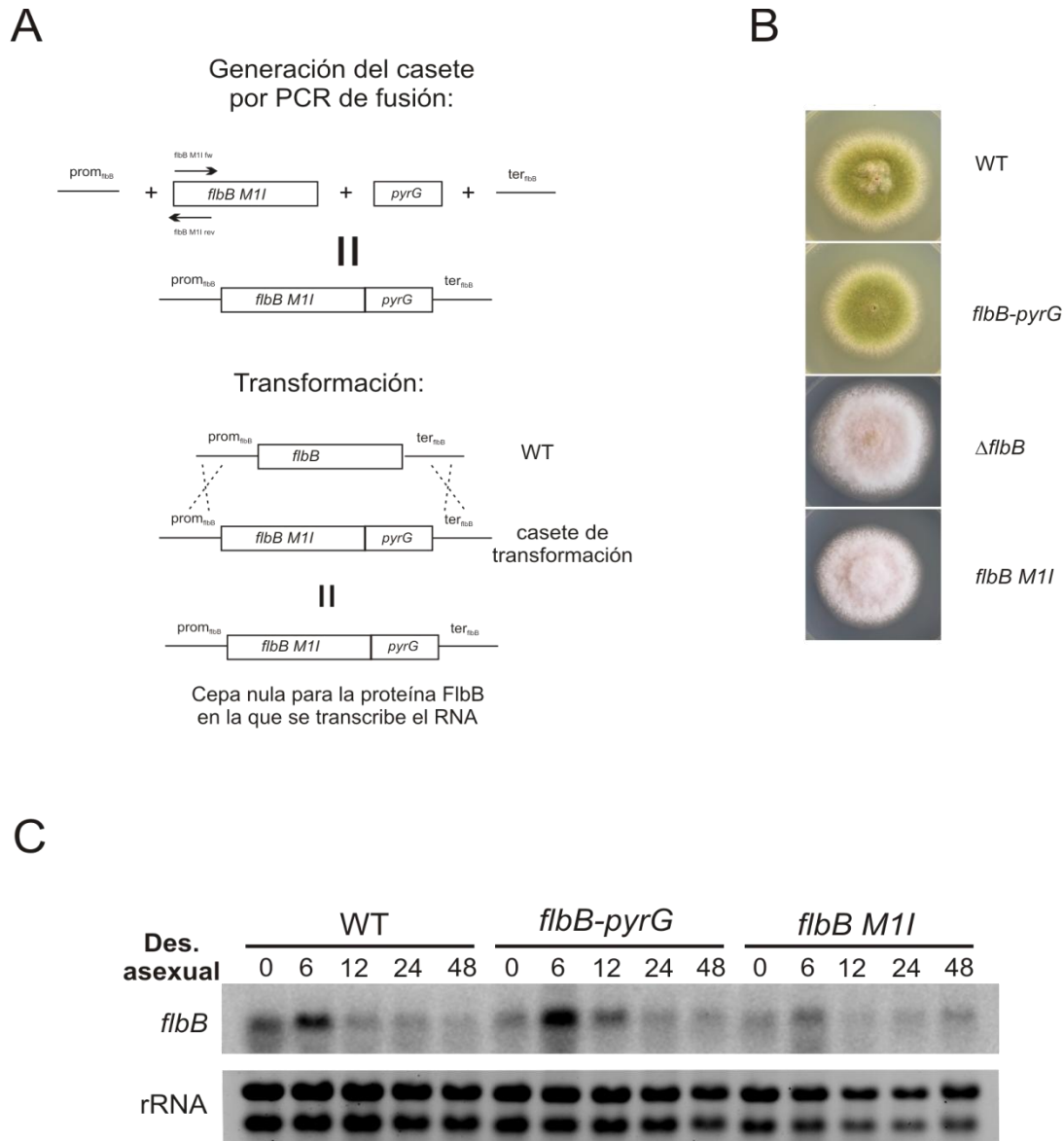
Tanto la cepa MAD2666 como la *flbB-pyrG<sup>Af</sup>* (BD382) muestran un patrón de expresión del transcrito de *flbB* similar, en el que se observa una elevación de su expresión a las 6h del desarrollo asexual, la cual es muy característica según se ha podido observar en otros análisis (Garzia, A. sin publicar). Sin embargo, la cepa portadora de la mutación M11 en FlbB carece de esta elevación puntual y se observa una disminución general de la expresión de *flbB*. Estos resultados están a favor de la autorregulación de la expresión de *flbB*.

### **3.- Análisis fenotípico de formas mutantes de FlbB**

#### **3.1 Expresión dirigida de FlbB**

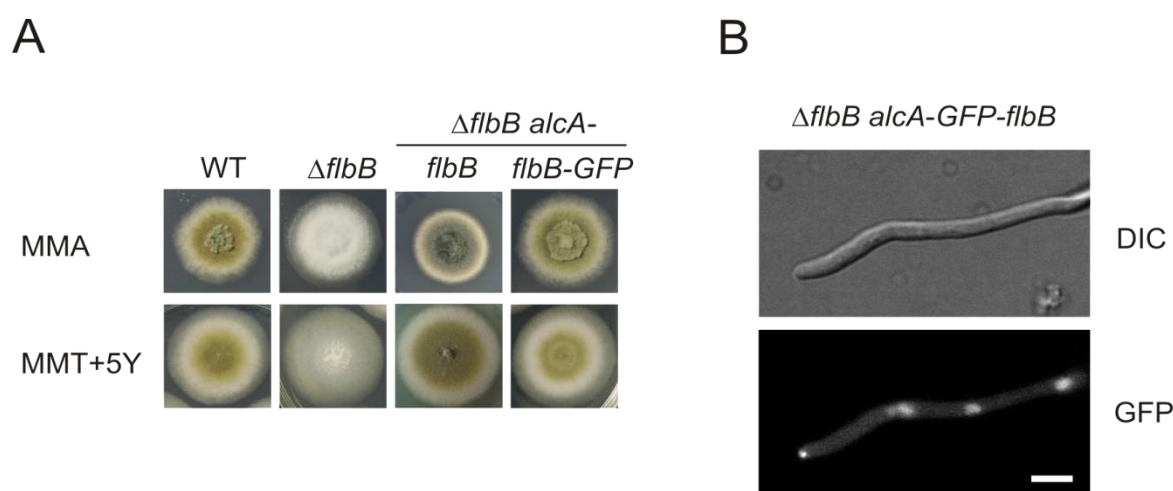
La muy probable autorregulación de FlbB condicionaba el estudio de la expresión de las formas mutantes hipofuncionales de FlbB, así como determinar la localización celular de éstas. Por ello se procedió a generar cepas que expresaran dichas formas mutantes mediante la utilización de un promotor independiente de FlbB.

Uno de los posibles promotores considerados fue el de la alcohol deshidrogenasa I, *alcA<sup>P</sup>*. Este promotor ha sido utilizado con relativa frecuencia en el laboratorio en estudios funcionales de elementos UDA y de la ruta CDP (Etxebeste *et al.*, 2009; Garzia *et al.*, 2009; Garzia *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2010a). Así, por ejemplo, se había generado una cepa que expresaba la forma completa de FlbB sin etiquetar bajo el control de *alcA<sup>P</sup>*, BD196. Se había caracterizado parcialmente su fenotipo observándose la formación de conidióforos sobre la colonia cuando se crecía al hongo en condiciones inductoras de la expresión de *alcA* (Garzia *et al.*, 2010) (figura R-14.A).



**Fig. R-13: La mutación M1I causa la pérdida de función de FlbB y la reducción de la expresión del transcrito de *flbB*:** A) Construcción del casete portador de la mutación en la metionina inicial de FlbB obtenido por PCR de fusión. Debajo, diagrama del fenómeno de recombinación esperado para dar lugar al reemplazamiento del alelo silvestre de *flbB* por la construcción *flbB M1I*. B) El fenotipo aconidial de la cepa mutante *flbB M1I* es indistinguible de la de  $\Delta flbB$ , mientras que las cepas control MAD2666 (WT) y BD382 (*flbB-pyrG*) esporulan profusamente. C) A pesar del evidente fenotipo aconidial, los niveles del transcrito de *flbB* en la cepa *flbB M1I* son similares a los observados en las cepas control, sin embargo se observa una notable reducción en la característica elevación en la expresión de *flbB* a las 6h tras la inducción de la conidiación.

Sin embargo, también se advertía conidiación en condiciones represoras del promotor, 1% de glucosa, demostrando que la represión de *alcA* era parcial. A continuación, se analizó la cepa que expresaba la quimera FlbB-GFP con este promotor, MAD4332 y se observó que de manera similar a la anterior, mostraba conidiación tanto en condiciones inductoras como represoras. Cuando se estudió su localización celular se visualizó a FlbB acumulado en todos los núcleos y en la punta de la hifa (figura R-14.B). Las condiciones de inducción del promotor *alcA* no son las idóneas para el análisis de formas mutantes de FlbB dado que son muy próximas a las condiciones de estrés nutricional que en determinados mutantes da lugar a supresión de su fenotipo aconidial (Etxebeste *et al.*, 2008), por lo que decidimos buscar un promotor alternativo.



**Fig. R-14: Expresión de FlbB bajo el control del promotor inducible *alcA*:** A) Fenotipo conidiante de las cepas  $\Delta flbB alcA-flbB$  y  $\Delta flbB alcA-flbB-GFP$  en condiciones inductoras para el promotor *alcA* mediante adición de 100mM treonina al medio de cultivo que además contiene 5g/l de extracto de levadura para promover el crecimiento micelial (MMT+5Y). La profusa conidiación en condiciones no inductoras (MMA, que contiene 1% glucosa) pone de manifiesto la represión parcial por el sistema de regulación por catabolito de carbono, mediada por CreA, del promotor *alcA*. B) En la cepa  $\Delta flbB alcA-flbB-GFP$ , FlbB presenta una distribución celular diferente al de la cepa silvestre, ya que además de en la punta de la hifa, se observa en los diferentes núcleos. Los niveles de fluorescencia son similares en todos ellos. Barra de escala: 5 $\mu$ m.

Así, decidimos expresar FlbB bajo otro promotor que es frecuentemente utilizado en el laboratorio. Es una versión truncada con menor nivel de expresión del promotor del gen que codifica para la gliceraldehido-3P-deshidrogenasa, *gpdA<sup>p</sup>*, denominado aquí *gpdA<sup>mini</sup>* (Pantazopoulou and Peñalva, 2009). En primer lugar se precisaba demostrar que *gpdA* se expresa en aquellas condiciones de cultivo e inducción de desarrollo asexual que se venían manejando. Para ello se realizó un estudio de la expresión de *gpdA* a diferentes tiempos entorno al habitual de recogida de micelio vegetativo y tras su inducción para el estudio del desarrollo (6h-12h). Como se observa en la figura R-15.A se pudo detectar la expresión de *gpdA* en dichas condiciones.

Una vez verificada la utilidad de este promotor, se procedió a construir un vector basado en el plásmido pgpd003 (Pantazopoulou and Peñalva, 2009) en el que se insertó un fragmento que codificaba para la fusión GFP-FlbB 1-426, y que fue denominado pgpdA-GFP-FlbB 1-426-pyroA (apartado M&M-1.3) (figura R-15.B). Este plásmido fue integrado en el locus mutante *pyroA4* de la cepa BD177 y entre los transformantes se procedió a seleccionar aquellos que, tras su análisis por “*Southern-blot*”, permitían determinar que contenían un solo plásmido integrado (1x), dos (2x) o más integraciones (nx) (figura R-15.C).

Primeramente, se analizaron las cepas portadoras de una sola copia del plásmido. Así, en la cepa MAD4321, tomada aquí como ejemplo, se observó que su fenotipo era conidiante (figura R-15.C), siendo muy similar al de una cepa silvestre. Este resultado demostraba la funcionalidad de FlbB en la cepa MAD4321 en las mismas condiciones de cultivo que para una cepa silvestre, validando el uso del promotor *gpdA<sup>mini</sup>*. El análisis fenotípico de las cepas con un mayor número de copias del plásmido, mostró el mismo fenotipo conidiante que las cepas de copia simple. La figura R-15.C muestra concretamente el fenotipo conidiante de la cepa MAD4322 con doble copia del plásmido, así como el de la multicopia MAD4324. Los experimentos de “*Western-blot*”, por otro lado, demostraron el incremento en los niveles detectables de la proteína GFP-FlbB 1-426 a medida que aumentaba el número de copias del plásmido en la cepa (figura R-15.D). Asimismo, es importante destacar que los niveles de FlbB son muy superiores a los

generados por su propio promotor incluso en las cepas portadoras de una sola copia del plásmido. Estos resultados indican que elevados niveles de FlbB en la célula no deben afectar al sistema o ruta de señalización de la conidiación.

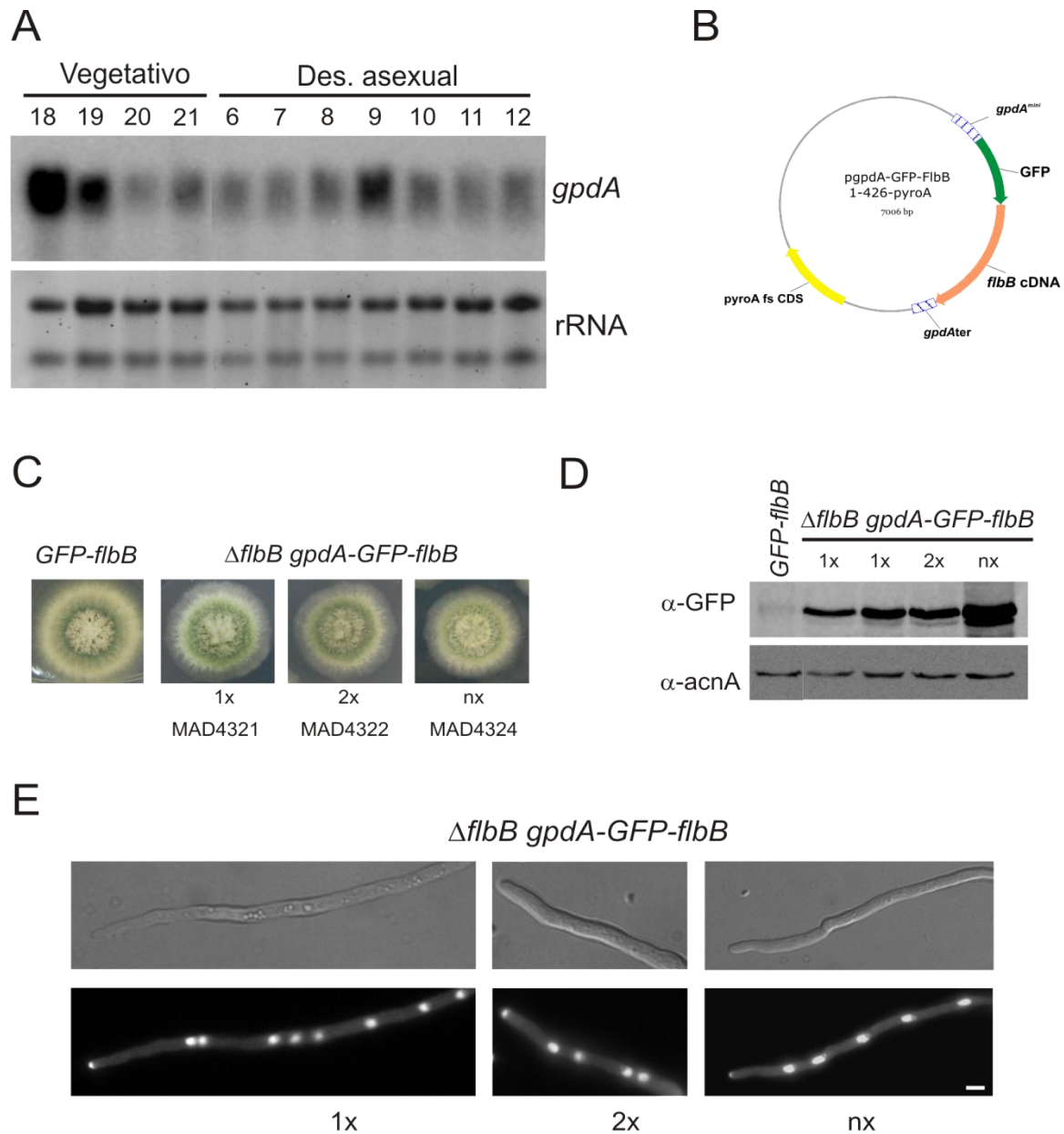
El análisis por microscopía de fluorescencia de la cepa portadora de la copia simple mostró una localización para la quimera similar a la descrita anteriormente con la expresión mediada por *alcA<sup>P</sup>*. Así, se observó acumulación en el ápice y una distribución regular de FlbB en todos los núcleos (figura R-15.E). Esta localización de FlbB se visualizó igualmente en las cepas con un mayor número de copias de la quimera GFP-FlbB 1-426. Es decir, se detectó un aumento proporcional en el nivel de fluorescencia tanto en la punta de la hifa como en los núcleos.

El conjunto de resultados muestra que elevados niveles de FlbB respecto a los endógenos no resultan perjudiciales ni modifican el normal desarrollo de la colonia, y tampoco afectan a la morfología celular. En cambio, sí es evidente la alteración en la localización celular de FlbB puesto que al elevarse los niveles de proteína, tanto con el promotor no inducible como con *alcA<sup>P</sup>*, se deja de observar la acumulación preferente de FlbB en el núcleo más apical. FlbB se localiza homogéneamente por todos los núcleos del sincitio y concluimos que esta redistribución de FlbB no debe afectar al sistema de inducción de la conidiación.

### 3.2 Sobreexpresión de FlbB en ausencia de FlbE

El uso del promotor constitutivo *gpdA<sup>mini</sup>* permitía ahora el estudio de FlbB en condiciones o fondos genéticos en los que no se había podido analizar previamente con el promotor nativo. En primer lugar se procedió a determinar la localización celular y el efecto de elevados niveles de FlbB en el fondo nulo de *flbE*.





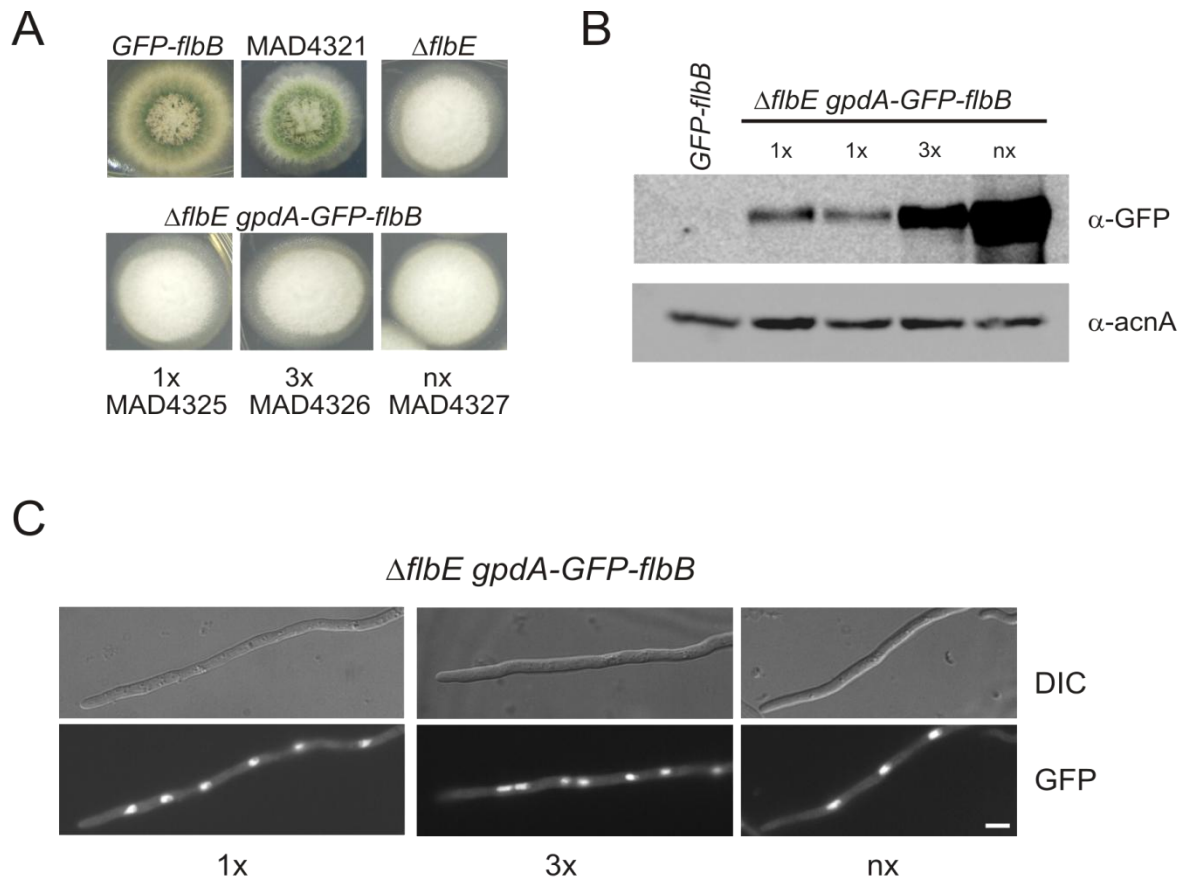
**Fig. R-15: Sobreexpresión de FlbB bajo el promotor *gpdA*:** A) La expresión constitutiva de *gpdA* en micelio vegetativo se mantiene a lo largo del proceso de diferenciación asexual (Des. asexual), mostrando su idoneidad para ser utilizado para expresar a FlbB de manera autónoma sin alterar la composición del medio de cultivo. B) Plásmido utilizado para expresar a FlbB bajo el promotor *gpdA*. Este plásmido incluye el epítipo GFP que permite su detección por microscopía y “*Western-blot*”, así como la región codificante truncada del gen *pyroA* para la integración en dicho locus. C) Las cepas portadoras de diferente número de copias del plásmido descrito muestran un fenotipo conidiante. D) Detección por “*Western-blot*” de la proteína GFP-FlbB 1-426 utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -GFP. La imagen muestra el incremento en los niveles de la proteína a medida que aumenta en la cepa el número de copias de la misma. Se ensayaron dos cepas que contenían una sola copia del plásmido, en ambos casos los niveles de la proteína de fusión fueron muy superiores a los detectados cuando se expresó bajo el propio promotor de *flbB* (carril *GFP-flbB*). E) En las células de las cepas que expresan constitutivamente a FlbB se observó la acumulación de la quimera en la punta de la hifa y en todos los núcleos del sincitio, independientemente del número de copias de FlbB en cada cepa. Las fotos de la cepas MAD4321, MAD4322 y MAD4324 se tomaron con los tiempos de exposición de 200ms, 100ms y 20ms, respectivamente, debido a la diferencia en los niveles de fluorescencia según la abundancia de la proteína de fusión.

La cepa *ΔflbE-ribo* (BD178) se transformó con el plásmido pgpdA-GFP-FlbB 1-426-pyroA, y se seleccionaron aquellos transformantes que portaban una o varias copias del plásmido. Así, la cepa MAD4325 contiene una sola copia del plásmido, MAD4326 tres copias y la cepa MAD4327 un número superior al anterior pero no definido (indicado como nx). El fenotipo de estas cepas con diferente número de copias de FlbB fue completamente aconidial, muy similar al de la cepa nula de *flbE* (figura R-16.A). Este fenotipo era independiente de los altos niveles de proteína FlbB detectados mediante “Western-blot” y que se incrementaban según el número de copias de la construcción (figura R-16.B), demostrando que la sobreexpresión de FlbB no es capaz de revertir el fenotipo de la cepa nula de *flbE*.

De acuerdo con el fenotipo aconidial, *fluffy*, de estas cepas no se observó la acumulación apical del FlbB etiquetado (figura R-16.C). Este resultado demostraba la estricta necesidad de FlbE para la formación del complejo apical, a pesar de los elevados niveles intracelulares de FlbB. Sin embargo, se pudo determinar que la ausencia de FlbE no interfiere con la localización nuclear del factor transcripcional puesto que éste se sigue acumulando en los núcleos independientemente del número de copias de la construcción (figura R-16.C). Por otro lado, la ausencia de conidiación a pesar de la acumulación nuclear de FlbB sugiere que la funcionalidad del factor transcripcional está supeditada a su migración al ápice donde debe ocurrir una modificación que dé lugar a una forma “activa o activada” de FlbB.

### 3.3 Papel de la cisteína C382 en la formación del complejo apical

La localización descrita para FlbB en ausencia de FlbE se asemeja a la previamente encontrada para la cepa portadora de múltiples copias de un plásmido que expresa FlbB 1-361 (MAD4315), sugiriendo que el extremo carboxilo terminal de FlbB también es necesario para su localización y acumulación en la punta de la hifa.



**Fig. R-16: Efecto epistático del alelo nulo de *flbE* sobre la sobreexpresión de FlbB:** A) Todas las cepas  $\Delta flbE$  *gpdA-GFP-flbB* exhiben el mismo fenotipo aconidial que el de una cepa  $\Delta flbE$ , independientemente del número de copias del plásmido que portan. B) El revelado del “Western-blot” en el que se ha utilizado el anticuerpo  $\alpha$ -GFP muestra un incremento de la intensidad de la banda detectada para GFP-FlbB 1-426, a medida que aumenta el número de copias de la proteína en la cepa. Se usó la detección de actina como control de carga ( $\alpha$ -actnA). C) Independientemente del número de copias, en ausencia de FlbE, FlbB se localiza únicamente en los núcleos, perdiendo la acumulación en la punta de la hifa. Barra de escala: 5  $\mu$ m.

El estudio detallado de esta región C-terminal de FlbB destacó dos cisteínas, los residuos 382 y 397, que estaban altamente conservadas entre los diferentes homólogos en hongos filamentosos (figura R-17.A) y que también se encuentran en el factor Yap1 de *S. cerevisiae*. Estas cisteínas podrían estar implicadas en la señalización de FlbB, a través de la formación de puentes disulfuro (Cortese *et al.*, 2011), como ocurre en Yap1p (Kuge *et al.*, 2001) o mediante modificaciones de sus cadenas laterales con ácidos grasos lo que podría conllevar una asociación con membranas, como es el caso de la prenilación (Roskoski, Jr., 2003). Por todo esto, nos enfocamos en determinar la función de dichas cisteínas en el proceso de señalización de FlbB.

Para determinar el papel de las cisteínas C382 y C397 en la localización celular de FlbB se generaron cepas que expresaban una forma mutante de FlbB en la que se había sustituido de forma independiente cada cisteína por alanina, en una aproximación metodológica similar a la descrita en el apartado 1.2.5 para el dominio de dimerización (ver sección 4.6 de M&M). La cepa BD467 expresa la proteína mutante FlbB<sup>C382A</sup> y manifiesta un evidente fenotipo aconidial (figura R-17.B). Sin embargo, la cepa BD470 que expresa la forma FlbB<sup>C397A</sup> posee un fenotipo de conidiación muy similar al de la cepa silvestre, lo que demuestra un papel esencial de la cisteína conservada en posición 382 de FlbB. Conforme a estos resultados y según el modelo actual de autorregulación de FlbB, se detectaron niveles silvestres de la proteína de fusión con la mutación C397A demostrando así su funcionalidad, mientras que no fue posible detectar a la proteína mutante FlbB<sup>C382A</sup> (figura R-17.C). La localización celular de GFP-FlbB<sup>C397A</sup> fue indistinguible de la distribución de la forma silvestre mientras que, y de acuerdo con los bajos niveles de proteína, no se observó fluorescencia debida a la forma GFP-FlbB<sup>C382A</sup> (figura R-17.D).

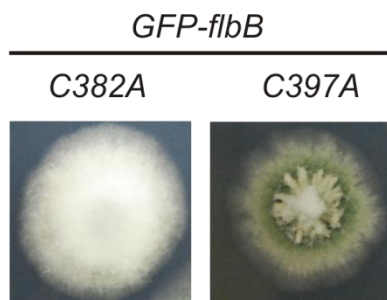
Con estos resultados, queda patente que mientras la cisteína C397 no influye en la funcionalidad de FlbB, la cisteína C382 juega un papel importante en ella, ya que una mutación en la misma causa un fenotipo aconidial. Aun así, la autorregulación de FlbB condiciona el estudio de esta mutación, por eso, se diseñó una nueva construcción en la que pudiera expresarse FlbB<sup>C382A</sup> bajo el promotor constitutivo *gpdA<sup>mini</sup>*.

La metodología para generar una cepa *gpdA*-GFP-FlbB<sup>C382A</sup> fue la misma que la utilizada para introducir sustituciones puntuales en FlbB. Para ello se utilizó como molde el plásmido pgpdA-GFP-FlbB 1-426-pyroA y se procedió a realizar una PCR mutagénica con oligonucleótidos que introducían los cambios necesarios para generar la sustitución C382A y por consiguiente el plásmido pgpdA-GFP-FlbB 1-426 [C382A]-pyroA (ver detalles en sección 1.3 de M&M). Con este plásmido se transformó la cepa  $\Delta flbB$ -*ribo* (BD177) y nuevamente de entre los transformantes se seleccionaron aquellos que mostraban la integración de una copia (MAD4328), dos copias (MAD4329) y una integración múltiple (nx) (MAD4331) de la construcción mutante de FlbB.

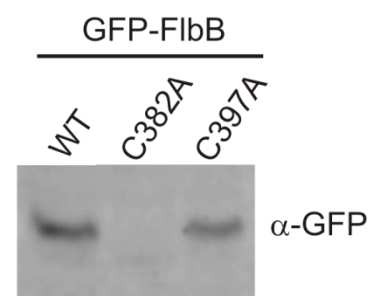
A

	C382	C397		
Aflav	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	VGSRVDMG-----FSRAGDDTLYS 427
Aoryz	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	VGSRVDMG-----FSRAGDDTLYS 427
Anige	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	LGSKVEGA-----LSHPGDEMYS 420
Aterr	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	LGGKVDVG-----FSRSEDHMLYS 434
Afumi	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	LGSKVDTS-----FSCAGDDTMYS 420
Nfisc	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	LGSKVDTR-----FSCAGDDTMYS 391
Aclav	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELMDCLSSV	LGSRVGPG-----MSLAADD---- 397
Anidu	LENKVR	CYGF	GAVLEDFELMDCLSSV	LGSKEGSGPVGVAFSRHADETMYS 426
Pchry	LNTKVR	CYGF	GAVVEDFELIDCLSSV	LGTKVDLG-----MSGTADDSMYG 410

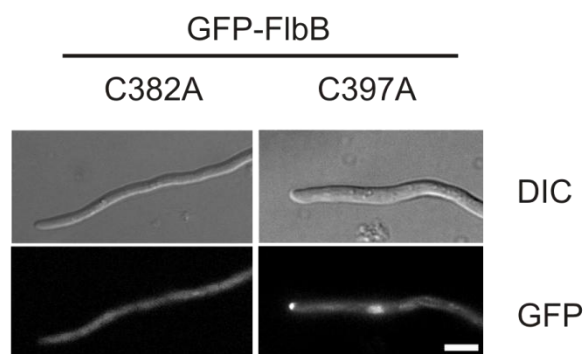
B



C



D



**Fig. R-17: Análisis funcional de las cisteínas conservadas en el extremo C-terminal de FlbB:** A) Alineamiento múltiple en el que se observa la gran conservación de las cisteínas 382 y la 397 de FlbB entre sus homólogos. Abreviaturas en el alineamiento: Aflav: *Aspergillus flavus*, Aoryz: *Aspergillus oryzae*, Anige: *Aspergillus niger*, Aterr: *Aspergillus terreus*, Afumi: *Aspergillus fumigatus*, Nfisc: *Neosartorya fischeri*, Aclav: *Aspergillus clavatus*, Anidu: *Aspergillus nidulans*, Pchry: *Penicillium chrysogenum*. B) Se muestran dos cepas recombinantes en las que se han introducido cambios en la secuencia de flbB que determinan las sustituciones de las cisteínas 382 o 397. La sustitución de la cisteína 382 por una alanina (C382A) da lugar a un fenotipo aconidial, mientras que la mutación C397A no afecta a su capacidad de conidiación. C) La proteína mutante C382A no se detecta en extractos proteicos totales. Sin embargo, la proteína mutante FlbB<sup>C397A</sup> se detecta como una banda del mismo tamaño (74kDa) y nivel de expresión que la de la cepa que expresa la forma silvestre. D) De acuerdo con el anterior resultado de inmunodetección, no se observa fluorescencia procedente de GFP-FlbB<sup>C382A</sup> en la célula. Respecto a FlbB<sup>C397A</sup>, esta forma mutante sigue la distribución descrita para la forma silvestre de FlbB, acumulándose en el ápice de la hifa y el núcleo más apical.

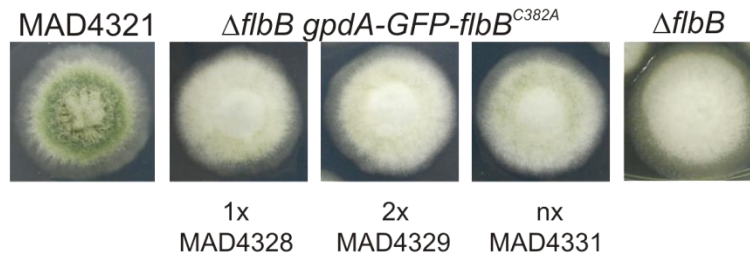
Como se observa en la figura R-18.A el fenotipo de las anteriores cepas fue totalmente aconidial evidenciando así la importancia de la cisteína 382 de FlbB en su función dentro de la ruta de la conidiación. El ensayo de “*Western-blot*” mostró el incremento de la expresión de la proteína a medida que aumentaba el número de copias del plásmido en la cepa (figura R-18.B); sin embargo se apreció una notable reducción en los niveles detectados comparados con los niveles endógenos y frente a los experimentos realizados con la proteína GFP-FlbB 1-426 expresada con *gpdA<sup>mini</sup>* en las figuras R-15.D y R-16.B, sugiriendo que esta mutación podría interferir en la estabilidad de la proteína. La localización de GFP-FlbB<sup>C382A</sup> en las anteriores cepas fue similar, observándose fluorescencia en todos los núcleos del compartimento celular pero ausente de la punta de la hifa (figura R-18.C). Este resultado mostraba que el papel de la cisteína C382 como elemento funcional de FlbB es participar en la formación del complejo apical. Sin embargo, estos resultados estarían en contra de la no formación del complejo puesto que se ha demostrado en la sección 1.2.3 que la región donde reside la cisteína 382 no se precisa para la interacción FlbB-FlbE.

### 3.4 Estudio de la distribución subcelular de FlbB

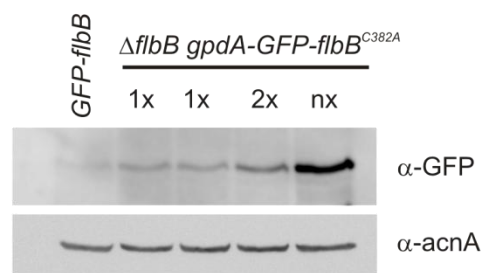
Puesto que la cisteína C382 de FlbB no debe participar en la interacción entre FlbB y FlbE pero sí en su localización en la punta de la hifa hipotetizamos que su función podría estar relacionada con el anclaje del complejo al ápice.

Como anteriormente se ha sugerido la posibilidad de la modificación por grupos prenilos de la cadena lateral de la cisteína, procedimos a verificar la asociación de FlbB con membranas. Para ello se estudió la distribución de FlbB en un experimento de fraccionamiento subcelular, en el que consecutivos pasos de centrifugación sirven para separar aquellas fracciones con diferentes componentes celulares (orgánulos) y grandes complejos asociados a membranas, de la que contiene el material soluble que se encuentra libre en el citoplasma (ilustrado en figura R-19.A y detallado en sección 8 de M&M). Para ello, se escogió la cepa que expresa FlbB-3xHA, puesto que el análisis de las fracciones se hace mediante detección por “*Western-blot*”.

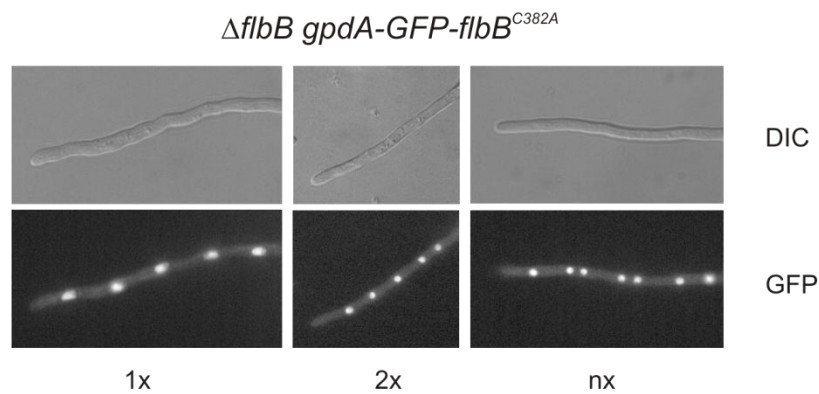
A



B



C



**Fig. R-18: FlbB<sup>C382A</sup> es una proteína nuclear pero no es funcional:** A) Las cepas  $\Delta flbB$  *gpdA-GFP-flbB<sup>C382A</sup>* muestran un fenotipo aconidial independientemente del número de copias de la construcción que portan. B) “*Western-blot*” que muestra el incremento de los niveles de la proteína mutante según el número de copias presentes en la cepa. La detección de los niveles de actina se utiliza nuevamente como control de carga. C) FlbB<sup>C382A</sup>, independientemente de su concentración en la célula, se acumula únicamente en los núcleos de la hifa.



El material de partida son protoplastos de la cepa de interés por lo que se siguen los pasos iniciales del protocolo de la transformación de *A. nidulans* (ver sección 3 de M&M). Los protoplastos en suspensión fueron tratados mecánicamente para obtener una ruptura celular. Esta mezcla heterogénea se sometió a los diferentes pasos de centrifugación descritos en la figura R-19.A. Las proteínas contenidas en las fracciones fueron precipitadas por el procedimiento habitual con TCA (ver sección 6.1 de M&M) y posteriormente resuspendidas en tampón de electroforesis de SDS-PAGE para su análisis. Las diferentes muestras se separaron electroforéticamente en dos geles de poliacrilamida-SDS, uno para su tinción con Coomassie y el duplicado para la detección de FlbB por “*Western-blot*” utilizando un anticuerpo  $\alpha$ -HA.

Los resultados de la primera imagen de la figura R-19.B demuestran que a pesar de la correcta visualización de proteínas en todas las fracciones mediante tinción por Coomassie, no pudo detectarse FlbB-3xHA en ninguna de las fracciones. La detección de FlbB-3xHA procedente de un extracto proteico total (ver último carril del gel) sugiere que FlbB no está presente, al menos en cantidades suficientes, en los extractos proteicos procedentes de un lisado de protoplastos.

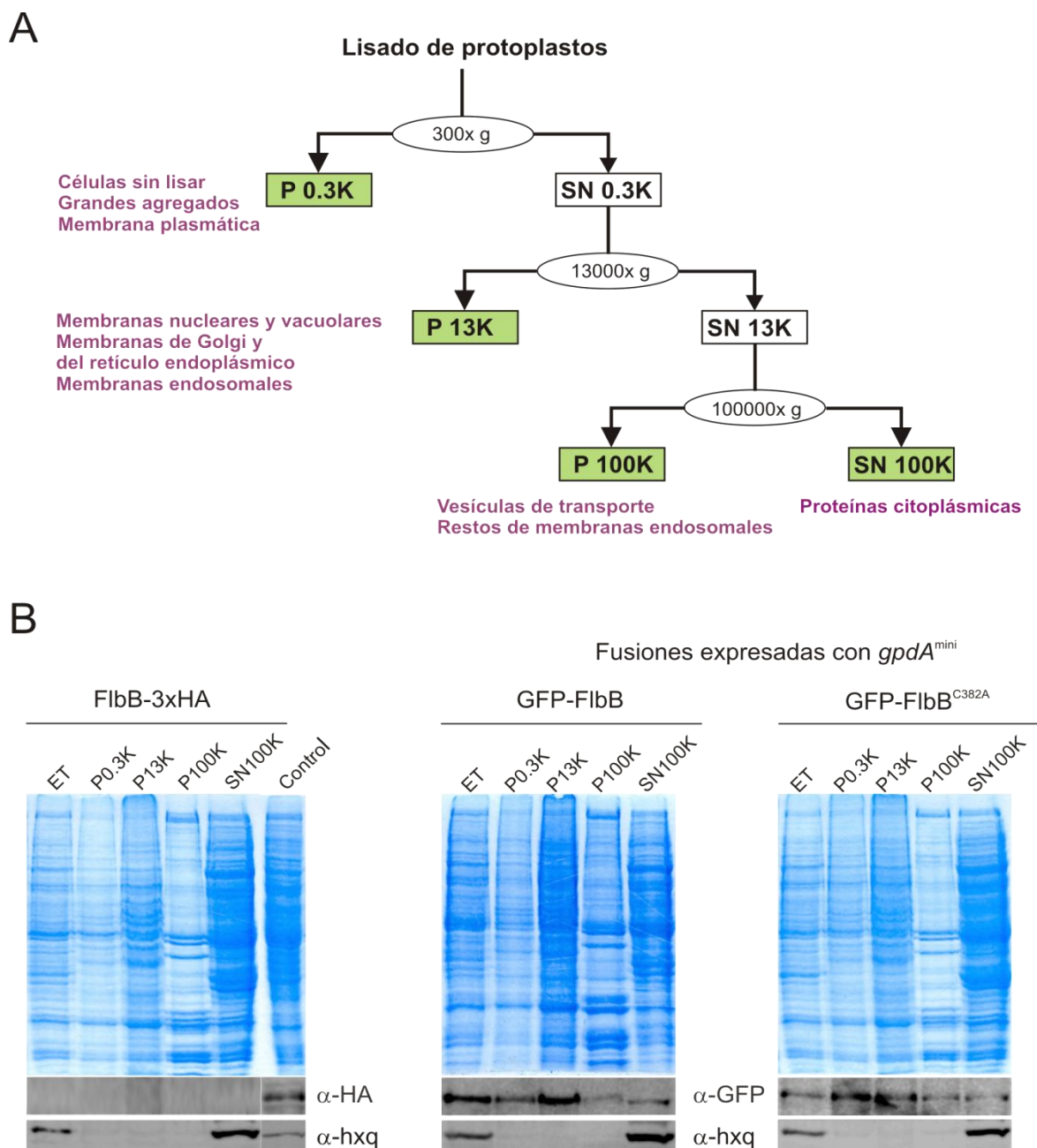
Seguidamente, decidimos realizar el mismo experimento con la cepa que expresa GFP-FlbB 1-426 bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, para comprobar si una mayor cantidad de proteína permitía su detección. Así, este nuevo ensayo proporcionó los resultados mostrados en la imagen central de la figura R-19.B en la que se detecta GFP-FlbB 1-426 en todas las fracciones. La presencia de la proteína soluble hexoquinasa únicamente en las fracciones correspondientes al extracto total y a la fracción que recoge proteínas citoplásmicas, validó la correcta separación de las fracciones. Este resultado sugería que FlbB podría estar asociado a diferentes componentes celulares o membranas además de una fracción soluble, libre en el citoplasma. La fracción P13K debe contener a la población nuclear de GFP-FlbB. La fracción P0.3K podría mostrar a FlbB asociado a estructuras membranosas de grandes dimensiones o complejos proteicos. De hecho una proteína exclusivamente localizada en la membrana plasmática se aísla preferentemente en esta



fracción (Cobeño, 2010). La fracción P100K representaría mayoritariamente vesículas de transporte y FlbB también es detectado en dicha fracción.

Dado que la proteína GFP-FlbB<sup>C382A</sup> no se acumula en el ápice de la célula se pasó a evaluar la eficacia de este sistema de análisis de distribución subcelular con esta forma mutante de FlbB.

Un fraccionamiento utilizando protoplastos de la cepa que expresa GFP-FlbB<sup>C382A</sup> mostró una distribución de la proteína mutante muy similar a la de GFP-FlbB. Esta forma mutante se detecta en todas las fracciones (imagen derecha de la figura R-19.B). Este resultado indica que las diferencias de localización entre estas dos proteínas no se ven reflejadas en este tipo de experimento y que las posibles asociaciones que se hipotetizan en el párrafo anterior, de existir, deben ser independientes de C382.



**Fig. R-19: Distribución de FlbB en fracciones subcelulares de protoplastos:** A) Esquema de los pasos de centrifugación seguidos en el fraccionamiento de protoplastos y el contenido esperado para cada una de las fracciones obtenidas. B) Análisis de las fracciones de 3 cepas diferentes mediante geles de poliacrilamida-SDS. Uno de los geles se somete a la tinción con Coomassie, mientras que el duplicado se utiliza para la detección de la proteína etiquetada mediante “Western-blot”. La detección de la proteína soluble hexoquinasa con anticuerpos específicos ( $\alpha$ -hxq) fue utilizada como control de calidad de la correcta lisis celular y para mostrar la separación de la fracción de proteínas solubles del resto de fracciones que contienen orgánulos o vesículas. No fue posible detectar a la proteína FlbB-3xHA en las diferentes fracciones subcelulares o en el extracto total a partir de protoplastos. Sin embargo, en la cepa que expresa FlbB bajo el promotor *gpdA<sup>mini</sup>*, se detecta a GFP-FlbB en todas las fracciones. La distribución de las proteínas FlbB<sup>C382A</sup> y FlbB es similar en los fraccionamientos realizados, por lo que esta aproximación experimental no permite reflejar las diferencias de localización entre las dos formas de FlbB observadas al microscopio.

## **4.- Factores que influyen en la expresión de *brlA***

### **4.1 FlbD**

FlbD es un factor transcripcional del tipo c-Myb que también pertenece al grupo de los activadores tempranos del desarrollo. De acuerdo con su probada función como factor transcripcional una quimera FlbD-GFP se localiza en el interior nuclear. Sin embargo, a diferencia de FlbB y en común con otros factores transcripcionales, se observa su localización en cada uno de los núcleos de la hifa (Garzia *et al.*, 2010). En estudios previos se ha establecido la existencia de una relación funcional y transcripcional entre los productos de *flbB* y *flbD*. FlbB regula positivamente la expresión de *flbD* y ambos factores transcripcionales activan conjuntamente al gen maestro de la conidiación, *brlA*. Dicha regulación se realiza mediante el reconocimiento de dianas para cada factor muy próximas entre sí en el promotor de este gen. Aparentemente, dicho reconocimiento requiere de una acción concertada entre FlbB y FlbD (Garzia *et al.*, 2010).

Para descifrar el mecanismo molecular de la acción correguladora de FlbB y FlbD se había procedido en primer lugar en el laboratorio a detectar *in vivo* la interacción entre ambos factores en el interior nuclear. Para ello se realizó un experimento basado en la Complementación Bimolecular de Fluorescencia de YFP, en el que se estudiaban las quimeras FlbB-YFP<sup>N</sup> y FlbD-YFP<sup>C</sup>. Sin embargo, no se observó fluorescencia de la proteína reconstituida en el primer núcleo, donde era predecible su detección, ni en otra localización celular. Por lo tanto, mi trabajo se enfocó hacia la detección de una posible interacción entre ambos factores utilizando técnicas de “pull-down”.

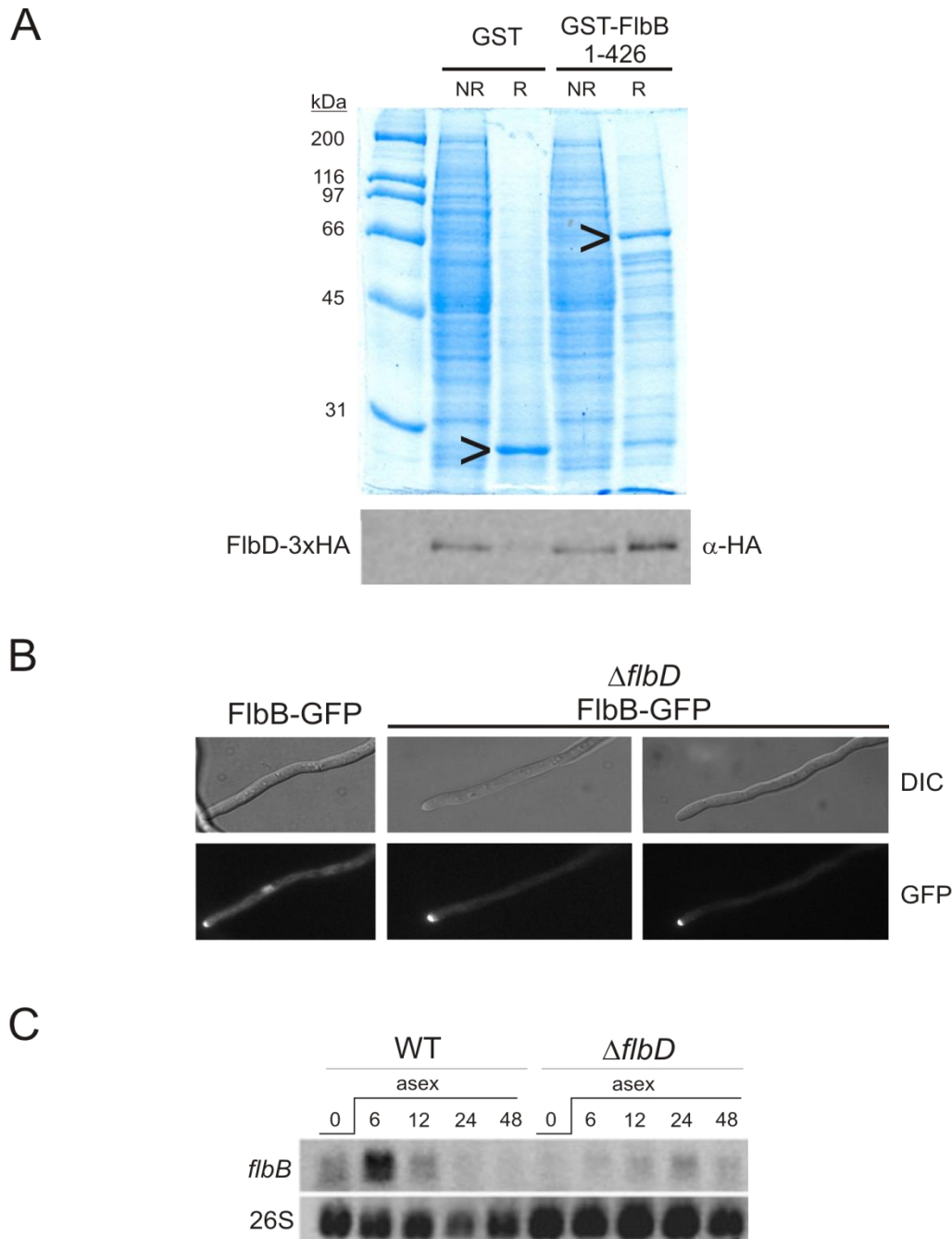
Inicialmente se ensayó la posible interacción entre el cebo FlbB expresado en *E. coli*, GST-FlbB 1-426, y la presa FlbD-3xHA, expresada en la cepa BD375 (Tabla M&M-1). La figura R-20 muestra en el panel A los controles de carga y expresión correspondientes al ensayo junto con el resultado del mismo. El revelado del ensayo de interacción con el anticuerpo  $\alpha$ -HA permitió la detección de una banda de 47kDa correspondiente a FlbD-3xHA en la fracción retenida (R) con GST-FlbB, mientras que no fue detectada en el control negativo de interacción, GST. Por lo tanto, este experimento demuestra que

existe un complejo proteico en el que participan ambos factores transcripcionales. Este resultado es congruente con el obtenido en el estudio por CHIP del promotor del gen *brlA*, donde se evidenciaba la formación de un posible complejo DNA-[FlbB-FlbD] (Garzia *et al.*, 2010).

A continuación se analizó el efecto de dicha interacción en la localización de FlbB. Para ello se generó la cepa MAD4333 que permitía estudiar el comportamiento de la quimera FlbB-GFP en el fondo nulo *flbD*. La localización de FlbB en el ápice no cambia sustancialmente frente a la observada en una cepa *flbD* silvestre, sin embargo, la acumulación nuclear sí parecía verse afectada en tal grado que la mayoría de las células analizadas son como se observan en la figura R-20.B, y una cantidad menor de ellas como anteriormente se había publicado en (Garzia *et al.*, 2010). Este resultado nos sugirió que una de las funciones de FlbD pudiera ser el reclutamiento de FlbB al interior del núcleo mediante esta interacción proteína-proteína, la cual tendría un papel adicional en la transcripción de los genes bajo su control. Además de *brlA*, en este fondo mutante nulo *flbD* debería estar afectada la expresión de *flbB* debido al circuito de autorregulación descrito anteriormente. Una revisión de resultados previos nos evidencia este posible efecto, dado que el transcrito de *flbB* en un fondo nulo para *flbD*, pierde la característica elevación de su expresión a las 6h tras la inducción de la conidiación (figura R-20.C) (Garzia *et al.*, 2010).

#### **4.2 La enzima glucosa-metanol-colina oxidorreductasa, GmcA**

Con el objetivo de encontrar genes diana de FlbB, se llevó a cabo un experimento en el laboratorio donde se compararon los patrones bidimensionales de movilidad electroforética de las proteínas extraídas de una cepa silvestre (MAD1425) frente a las de una cepa nula de *flbB* (BD143). Se observaron diferencias en los niveles de algunas proteínas (detectadas mediante tinción con el Kit de Azul Coloidal de Invitrogen), clasificándose en dos grupos: las proteínas reguladas positivamente y las reguladas negativamente por FlbB (figura R-21.A, ver tabla R-2).



**Fig. R-20: Interacción molecular, celular y transcripcional entre FlbD y FlbB:** A) Utilizando como cebo a la fusión GST-FlbB fue posible capturar a FlbD-3xHA desde extractos proteicos. En la parte superior del panel se muestra el gel teñido con Coomassie en el que se aprecia el patrón de bandas del extracto fúngico utilizado y las proteínas bacterianas GST (26kDa) o GST-FlbB 1-426 (73kDa) retenidas en la resina, indicadas con el símbolo (>). En la parte inferior el revelado del “Western-blot” con anticuerpos contra el epítipo HA (α-HA) muestra la presencia de la proteína FlbD-3xHA, con una movilidad electroforética correspondiente a una proteína de 47kDa, en la fracción retenida con GST-FlbB 1-426. La ausencia de esta proteína en la fracción retenida con GST valida la anterior interacción. B) A nivel celular, la localización de FlbB se ve modificada en ausencia de FlbD. En un fondo  $\Delta flbD$ , la proteína GFP-FlbB se sigue observando en la punta de la hifa pero no se aprecia acumulación nuclear en la mayoría de las células estudiadas. C) A nivel transcripcional se observa que la expresión de *flbB* está modificada en ausencia de FlbD. El característico pico de expresión de *flbB* a las 6h tras la inducción del desarrollo asexual desaparece en el fondo nulo *flbD*. Se utiliza la banda correspondiente al rRNA de 26S como control de carga de RNA.

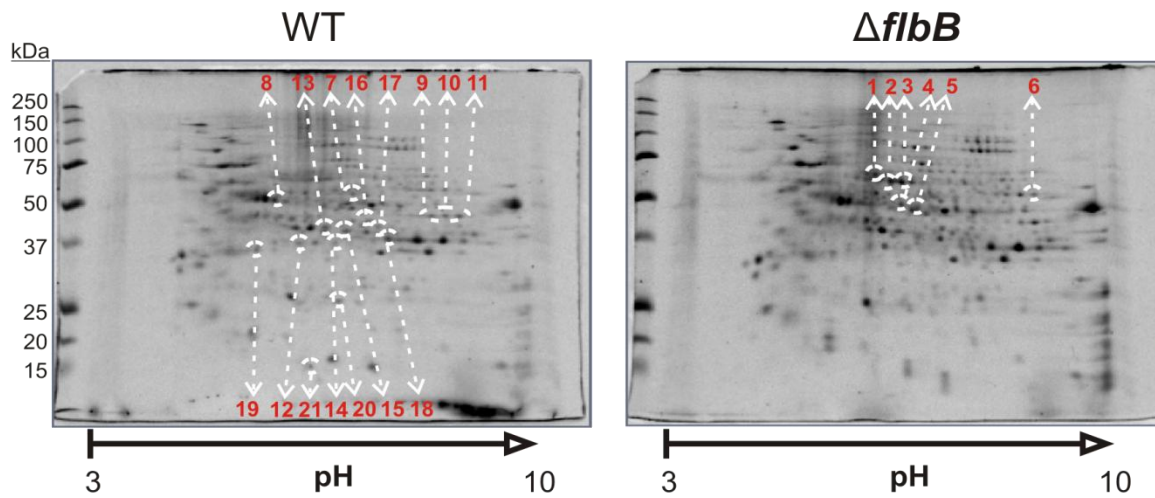
De entre todas ellas, con especial interés para esta memoria, se estudió en más detalle la proteína codificada por el gen AN8547.

En el proceso de verificación del efecto transcripcional de FlbB sobre cada uno de los candidatos encontramos que los niveles de la proteína codificada por el gen AN8547, denominado *gmcA*, estaban elevados en ausencia de FlbB (figura R-21.B). El gen *gmcA* codifica para una proteína que pertenece al grupo de las enzimas GMC, glucosa/metanol/colina oxidorreductasas, y cuyas siglas dan nombre al locus. Las enzimas incluidas en el grupo GMC pueden estar involucradas en la respuesta a estrés, y en especial las proteínas más similares a GmcA participan en la oxidación de alcoholes aromáticos y alifáticos a aldehídos, habitualmente liberando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zamocky *et al.*, 2004). El agua oxigenada es un compuesto oxidante y principal responsable de la respuesta ROS (Aguirre *et al.*, 2006).

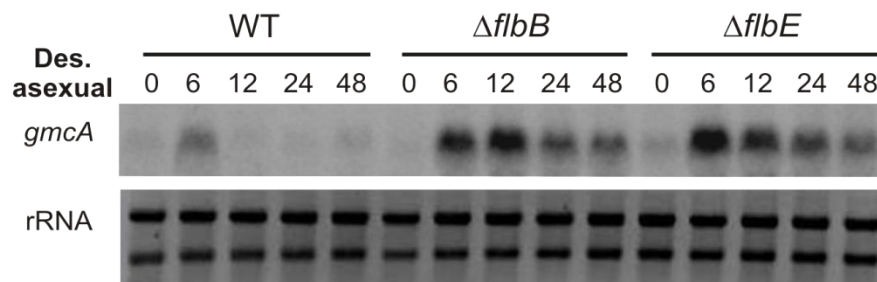
GmcA consta de 576 aminoácidos y el análisis filogenético muestra una cercanía con los subgrupos de las enzimas aril-alcohol oxidasas, glucosa oxidasas y alcohol oxidasas. Sin embargo, gracias a estudios realizados por el Dr. Cortese, se advirtió la presencia de diferencias en determinados grupos de aminoácidos que son clave para determinar su función, las cuales han permitido postular que GmcA podría pertenecer a una nueva subfamilia del grupo de proteínas GMC limitada evolutivamente al filo ascomicota (Etxebeste *et al.*, 2012).

De acuerdo con el experimento de selección de dianas de genes regulados por FlbB, los niveles del transcrito de *gmcA* estaban notablemente elevados en muestras de RNA extraídas de la cepa nula de *flbB* crecida en condiciones de inducción de desarrollo asexual y contrastaban con los bajos niveles encontrados en la cepa silvestre (figura R-21.B). Consistente con el mecanismo de señalización de FlbB la expresión de *gmcA* también se elevaba en un fondo nulo de *flbE* evidenciando nuevamente (demostrado para *brlA*) la falta de función transcripcional de FlbB en dicho fondo genético (figura R-21.B).

A



B



**Fig. R-21: El gen *gmcA* está regulado por la actividad de FlbB:** A) Análisis comparativo de los dos geles 2D entre las proteínas extraídas a partir de una cepa silvestre y de una cepa  $\Delta flbB$ , en el cual se identifican 21 spots que presentan un nivel de detección diferencial. La identificación de las proteínas se realizó mediante espectrometría de masas y aparecen listadas en la tabla R-2. GmcA corresponde al spot 4. B) Niveles del transcrito de *gmcA* en muestras de RNA total extraídas de las cepas WT,  $\Delta flbB$  y  $\Delta flbE$ , a diferentes tiempos tras la inducción del desarrollo asexual mediante exposición del micelio al aire donde (0) marca el inicio de esta inducción tras 18h de cultivo del micelio vegetativo. La expresión de *gmcA* se eleva en los fondos genéticos  $\Delta flbB$  y  $\Delta flbE$ , durante la exposición del micelio al aire, estando de acuerdo con el resultado obtenido en el análisis bidimensional de proteínas.

Tabla R-2: Lista de proteínas cuyos niveles están afectados por la ausencia de función FlbB

Spot	Candidato <sup>a</sup>	Locus	Término GO (rol metabólico) <sup>b</sup>
<b>Spots con mayor intensidad en fondo genético <math>\Delta flbB</math> (<math>V_{WT}/V_{\Delta flbB} \leq 0.8</math>)</b>			
1	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>AN9148/galF</i>	Galactose catabolism.
2	Pyruvate decarboxylase	<i>An4888/pdcA</i>	Pyruvate metabolism. Menadione stress response.
3	Pyruvate decarboxylase	<i>An4888/pdcA</i>	Pyruvate metabolism. Menadione stress response.
4	<b>Glucose-methanol choline oxidoreductase</b>	<i>An8547</i>	<b>Glucose-methanol-choline oxidoreductase. Menadione stress response.</b>
5	6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating)	<i>AN3954</i>	Pentose-phosphate shunt. Response to oxidative stress.
6	NADP-specific glutamate dehydrogenase	<i>An4376/ gdhA</i>	Glutamate and glutamine metabolism. Menadione stress response.
<b>Spots con menor intensidad en fondo genético <math>\Delta flbB</math> (<math>V_{WT}/V_{\Delta flbB} \geq 1.2</math>)</b>			
7	2-methylcitrate dehydratase	<i>An6639/mcdB</i>	Lysine metabolism.
8	Enolase (2 phosphoglycerate dehydratase) ( <i>A. oryzae</i> )	<i>An5746/acuN</i>	Glycolysis and gluconeogenesis. Osmotic and menadione stress response.
9	Citrate synthase	<i>An8275/ citA</i>	Tricarboxylic acid cycle.
10	Citrate synthase	<i>An8275/ citA</i>	Tricarboxylic acid cycle.
11	Citrate synthase	<i>An8275/ citA</i>	Tricarboxylic acid cycle.
12	Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase	<i>An8041/ gpdA</i>	Glycolysis and gluconeogenesis Osmotic stress response
13	UDPglucose-4 epimerase	<i>An4727/ugeA</i>	Galactose and galactitol metabolism. Menadione stress response.
14	NADP+-dependent glicerol dehydrogenase	<i>An5563/gldB</i>	Glycerol metabolism. Osmotolerance.
15	Fructose-1,6 bisphosphate aldolase	<i>An2875/fbaA</i>	Glycolysis and gluconeogenesis
16	Not identified	-----	-----
17	Formate dehydrogenase	<i>An6525/ aciA</i>	Oxalic acid metabolism. Menadione stress response.
18	Aspartate transaminase	<i>An6048</i>	Amino acid metabolism.
19	Transaldolase	<i>An0240/pppA</i>	Pentose-phosphate shunt. Oxidative stress response.
20	Triose-phosphate isomerase	<i>An6900/tpiA</i>	Glycolysis and gluconeogenesis.
21	Ribose-5-phosphate isomerase (ribose/ galactose isomerase)	<i>An5907</i>	Pentose phosphate pathway. Menadione stress response.

<sup>a,b</sup> Las proteínas identificadas y el termino GO correspondiente se nombran con su denominación en la base de datos en inglés.

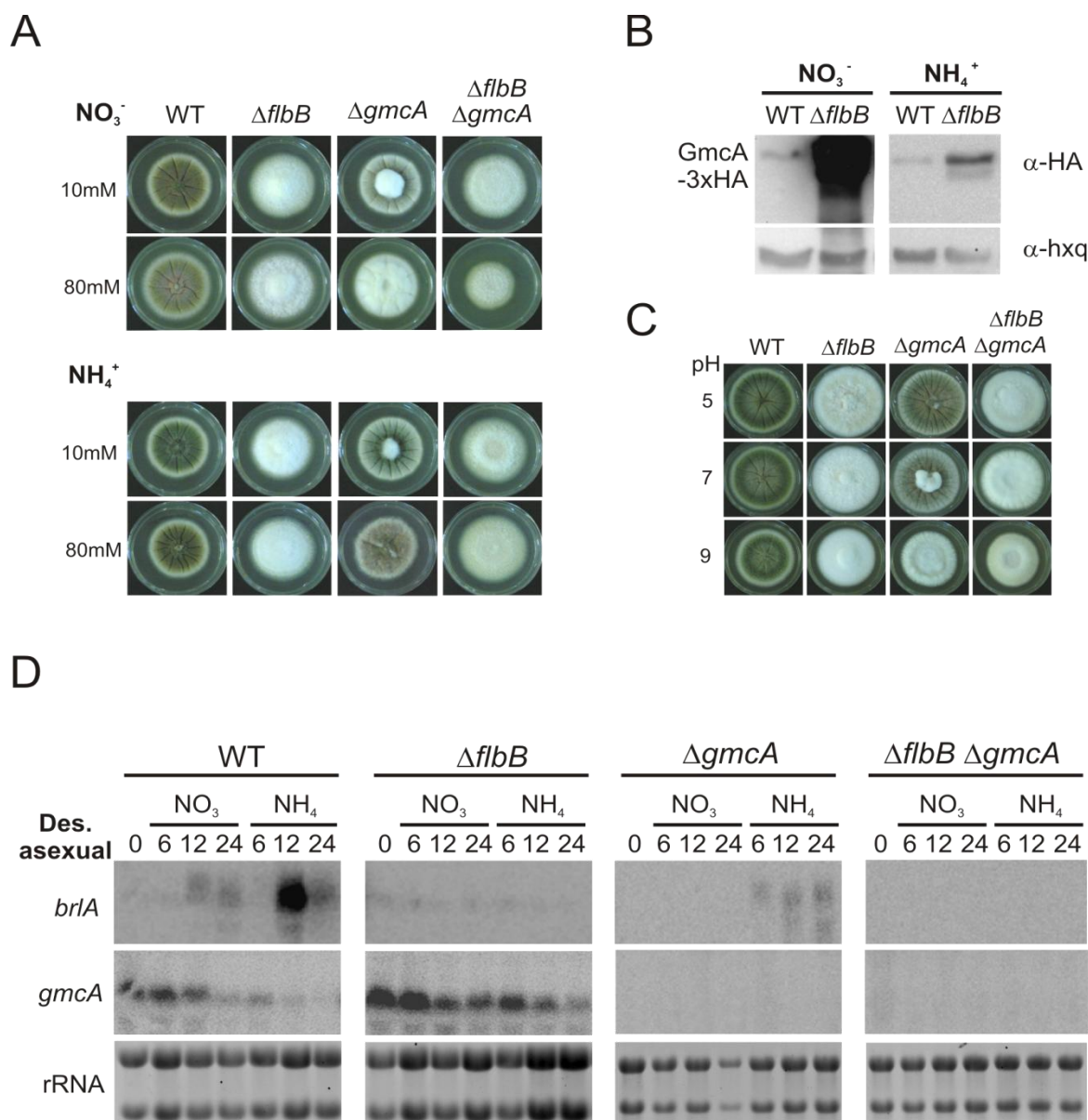


Para estudiar la función de *gmcA* en la célula, se construyó una cepa nula *gmcA* (BD429) y se analizó su fenotipo. La pérdida de la función GmcA produjo una significativa reducción en la capacidad de conidiación del mutante  $\Delta gmcA$  similar a la que muestra la cepa nula *flbB* (figura R-22.A). Además, el doble mutante  $\Delta flbB \Delta gmcA$  (cepa BD431) mostró un fenotipo aditivo, dado que la cepa era aún más aconidial que los mutantes simples.

Las diferencias encontradas en el fenotipo de diferenciación asexual de la cepa  $\Delta gmcA$  dependen además de la fuente de nitrógeno utilizada. El mutante nulo *gmcA* muestra un fenotipo más aconidial sobre medio con nitrato que con amonio, de hecho el efecto del primero da lugar a un fenotipo prácticamente *fluffy*. Los niveles de la proteína GmcA-3xHA expresada por las cepas  $\Delta flbB$  (BD444) y WT (BD440) eran diferentes y dependían de la fuente de nitrógeno utilizada. En medio conteniendo nitrato la expresión de GmcA fue mucho más elevada en la cepa  $\Delta flbB$  mientras que dicho efecto no se observó en la cepa silvestre (figura R-22.B).

La utilización de nitrato como fuente de nitrógeno por el hongo causa la alcalinización del medio al consumirse un elevado número de protones en el proceso. Por ello, se estudió la posibilidad de que fuera el pH el causante de dicho efecto aconidial sobre la cepa mutante  $\Delta flbB$ . La cepa  $\Delta gmcA$  fue cultivada sobre medio ajustado a diferentes valores de pH, pH=5, 7 y 9 y se analizó su capacidad de conidiación. La figura R-22.C muestra las variaciones fenotípicas de la cepa nula *gmcA* en función del pH del medio. En condiciones de cultivo alcalinas la cepa es *fluffy*, mientras que según se acidifica el pH del medio, dicha cepa es capaz de desarrollarse asexualmente, de lo que se deduce que la actividad de GmcA se requiere principalmente en condiciones de pH alcalino.

La ausencia de función de FlbB da lugar a la reducción en la expresión del gen maestro de la conidiación, *brlA*. Para determinar si la ausencia de función GmcA tiene un efecto similar a nivel transcripcional se analizó la expresión de *brlA* en las diferentes fuentes de nitrógeno y fondos genéticos (figura R-22.D).

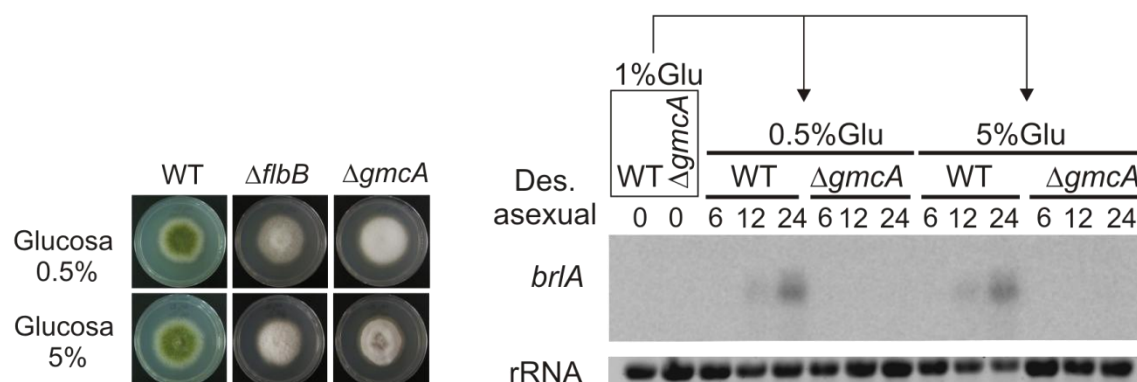


**Fig. R-22: Estudio fenotípico del mutante nulo de *gmcA*:** A) La cepa nula de *gmcA* presenta una reducción importante en su conidiación respecto a la cepa silvestre. Además, el doble mutante  $\Delta flbB \Delta gmcA$  ofrece un fenotipo más *fluffy* que cada uno de los nulos simples. Este fenotipo aconidial del mutante nulo de *gmcA* es más acusado cuando se utiliza nitrato en el medio de cultivo que cuando se utiliza amonio. B) Los niveles de proteína GmcA son más elevados en ausencia de *flbB* que en una cepa WT, y dependen de la fuente de nitrógeno utilizada, estando incrementados en medio con nitrato. C) El efecto de la fuente de nitrógeno sobre el fenotipo de la cepa  $\Delta gmcA$  está causado por las variaciones del pH del medio debido a su metabolismo, así la capacidad de conidiar de una cepa nula *gmcA* tiene una relación inversa con la progresiva alcalinización del medio. D) La reducción en desarrollo asexual (medido como la capacidad de formar conidióforos sobre la colonia) está estrechamente relacionada con los niveles de transcripción de *brlA*. Se observa un incremento del nivel de expresión de *brlA* en la cepa WT cultivada con amonio como principal fuente de nitrógeno frente a la utilización del nitrato. La notable reducción de la expresión de *brlA* en la cepa  $\Delta gmcA$  en ambas condiciones explicaría su fenotipo aconidial. Finalmente, la causa del fenotipo aconidial más acusado del doble mutante es el nivel de expresión tan reducido del transcrito de *brlA*, prácticamente indetectable en el “Northern-blot”.

En general se observó una significativa reducción de la expresión de *brlA* en el nulo de *gmcA*, comparable con la que causa un alelo  $\Delta flbB$ . Muy interesante fue también el hecho de que los niveles de *brlA* fueran prácticamente indetectables en el doble mutante  $\Delta flbB\Delta gmcA$ , lo que nos permitió concluir que el fenotipo aconidial podía explicarse sobre el grado de expresión de *brlA* en los diferentes fondos mutantes.

Además de la fuente de nitrógeno, quisimos estudiar la influencia de la fuente de carbono en el fenotipo de  $\Delta gmcA$  y en la expresión de *brlA* en esta cepa, ya que se ha descrito que diferentes concentraciones de glucosa influyen notablemente sobre el desarrollo asexual (Atoui *et al.*, 2010). Por ello, se ensayaron concentraciones bajas (0.5%) y altas (5%) de glucosa respecto a la estándar, pero como muestra la figura R-23.A no se encontraron diferencias en la reducida capacidad de conidiación, siendo  $\Delta gmcA$  completamente aconidial en ambos casos. Este fenotipo era congruente con la ausencia de expresión de *brlA*. A continuación, se decidió ensayar una fuente de carbono alternativa como el glicerol, también a bajas (1%) y altas (10%) concentraciones. Tal y como se muestra en la figura R-23.B, en este caso sí se observaron diferencias. Altas concentraciones de glicerol indujeron la conidiación en una cepa  $\Delta gmcA$ , la cual se tradujo en un incremento de la expresión de *brlA* en dicha cepa. Estos resultados sugieren que altas concentraciones de glicerol son capaces de sobrepasar la interrupción en la ruta de la conidiación impuesta por la ausencia de *gmcA*, activando el gen maestro de la CDP, *brlA*.

A



B



**Fig. R-23: Altas concentraciones de glicerol pueden revertir el fenotipo aconidial causado por el alelo  $\Delta gmcA$ :** A) Altas o bajas concentraciones de glucosa no afectan a la capacidad de conidiación del mutante nulo de *gmcA*. De acuerdo con ello, los niveles de transcripción de *brlA* no se ven alterados en esas condiciones. B) Altas concentraciones de glicerol promueven la conidiación en la cepa  $\Delta gmcA$ . El “Northern-blot” demuestra que el nivel de expresión de *brlA* en el mutante nulo *gmcA* es comparable al que muestra la cepa silvestre, demostrando una relación directa entre la supresión del fenotipo aconidial de la cepa  $\Delta gmcA$  y el nivel de expresión de *brlA* en las condiciones de cultivo.

## **5.- Inductores adicionales de la conidiación**

### **5.1 Luz**

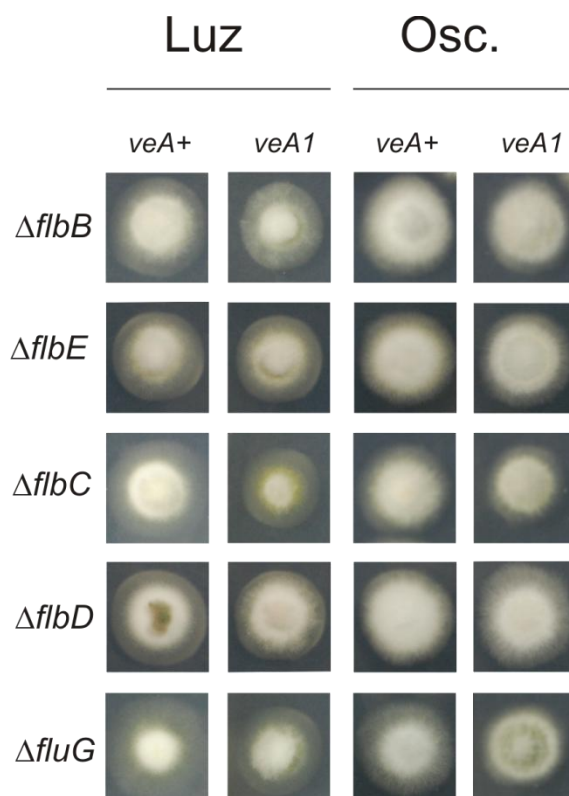
La conidiación en *Aspergillus* depende de un amplio rango de factores y la luz es uno de los principales estímulos abióticos. Velvet, el producto del gen *veA*, es el factor más importante que media en la respuesta a dicho estímulo. En todos los experimentos descritos anteriormente, no se ha tenido en cuenta este estímulo, ya que se han utilizado cepas portadoras del alelo *veA1*. Este alelo mutante de *veA* produce una forma de Velvet que carece de parte de la secuencia en su extremo N-terminal. La mutación *veA1* da lugar a la pérdida del codón iniciador original provocando que la proteína VeA1 comience en la metionina 37. VeA1 permite que el hongo produzca conidióforos en oscuridad y es por ello que las cepas *veA1* son ampliamente utilizadas por todos los laboratorios que trabajan con este hongo. De hecho los mutantes *flb<sup>-</sup>* fueron aislados en cepas *veA1* (Etxebeste *et al.*, 2008; Garzia *et al.*, 2009).

En este apartado, quisimos analizar el efecto de la luz en ausencia de la función de determinados genes *flb*. Para ello se obtuvieron una serie de cepas descendientes de cruces o por transformación que portaban el alelo silvestre del gen *veA* en combinación con cada uno de los alelos nulos en los genes *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE* y *fluG*. La cepa  $\Delta fluG$  *veA<sup>+</sup>* (BD234) se obtuvo mediante cruce de las cepas TTA127.4 ( $\Delta fluG$ ) y RRMD3.4 (*veA<sup>+</sup>*). De forma similar la  $\Delta flbB$  *veA<sup>+</sup>* (BD215) se obtuvo a partir del cruce entre las cepas BD165 ( $\Delta flbB$ ) y RRMD3.4 (*veA<sup>+</sup>*), mientras que  $\Delta flbE$  *veA<sup>+</sup>* (BD508) proviene del cruce BD142 ( $\Delta flbE$ ) y WIM126 (*veA<sup>+</sup>*). En los cruces realizados para la obtención de cepas  $\Delta flbD$  en fondos genéticos *veA<sup>+</sup>* no se pudo identificar el tipo de progenie que se perseguía, ya que fue muy difícil distinguir entre las cepas  $\Delta flbD$  *veA<sup>+</sup>* y *veA1*. Todos los descendientes seleccionados resultaron tener el alelo mutante *veA1*. Por tanto, y en caso de que hubiera una interacción genética entre  $\Delta flbD$  y *veA<sup>+</sup>* que impidiese obtener dicha progenie se decidió cambiar de estrategia y transformar la cepa RRMD3.4 (*veA<sup>+</sup>*) con el casete  $\Delta flbD$ -*pyrG*. No se encontró ningún problema para obtener una cepa  $\Delta flbD$  *veA<sup>+</sup>* con este procedimiento por lo que dicha interacción genética no debe existir. Problemas similares en cuanto a la selección de la progenie correcta ocurrieron al cruzar las cepas  $\Delta flbC$  y

*veA+*, por lo que se recurrió también a la transformación para obtener la cepa  $\Delta flbC$  *veA+*, transformando de nuevo la cepa RRMD3.4 (*veA+*) esta vez con el casete  $\Delta flbC$ -*pyrG*. Así, se obtuvieron las cepas  $\Delta flbD$  *veA+* (BD276) y  $\Delta flbC$  *veA+* (BD239). En todas estas cepas se comparó su capacidad de conidiación en el fondo *veA* silvestre y *veA1* mutante tanto en condiciones de luz como en oscuridad.

Para analizar la capacidad de formar conidióforos por las diferentes cepas generadas se cultivaron sobre medio mínimo sólido (MMA) durante 72h a una temperatura de incubación de 30°C bajo una fuente de luz o en oscuridad. Las diferentes condiciones de iluminación no afectaron al crecimiento radial de las colonias (figura R-24). En cuanto a la capacidad de conidiación de las cepas, la primera fila de la figura R-24 muestra el fenotipo aconidial causado por el alelo  $\Delta flbB$  en fondos *veA+* y *veA1*, tanto en luz como en oscuridad. De manera similar, tampoco se observa ningún signo de conidiación en el mutante nulo de *flbE* en ninguna de las condiciones estudiadas (fila 2 en la figura R-24). Los demás mutantes nulos *flb* también son aconidiales, a excepción del  $\Delta flbD$  *veA+*, el cual es capaz de esporular en condiciones de luz (1ª colonia de la fila 4 de la figura). Dado que este fenotipo no se puede considerar como una supresión completa no se procedió a un análisis más detallado, sin embargo debería ser objeto de estudio en posteriores trabajos de investigación.

A pesar de no haber visto diferencias fenotípicas en  $\Delta flbB$  *veA+* respecto al mutante portador del alelo *veA1*, quisimos estudiar en mayor profundidad la posible relación entre la luz y *flbB*. Esta parte del trabajo la llevamos a cabo en el laboratorio de la Dra. Calvo (Northern Illinois University, USA) en el que mediante protocolos estandarizados se midió tanto la producción de estructuras sexuales y asexuales de la cepa de interés como la producción de micotoxinas, todas ellas en condiciones de luz y de oscuridad.



**Fig. R-24: Estudio del efecto de la luz y de la proteína Velvet, VeA, en el fenotipo aconidial causado por mutantes nulos en los genes UDA:** La iluminación de las colonias no causa la supresión del fenotipo aconidial de los mutantes analizados. Asimismo, el fenotipo aconidial no se ve modificado por la presencia de una proteína velvet funcional. Indicar la parcial inducción de la conidiación en la zona central de la colonia de una cepa  $\Delta flbD$  con un fondo genético *veA* silvestre, pero únicamente cuando se cultiva en presencia de luz.

### 5.1.1 Producción de esterigmatocistina

El estudio de las micotoxinas producidas por parte del mutante  $\Delta flbB$  se centró en la producción de la esterigmatocistina (ST). Este compuesto es un intermediario de la ruta de biosíntesis de la aflatoxina y que de manera similar a ésta tiene propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas aunque con menor potencia. La ST es producida por *A. nidulans* dado que carece de los pasos enzimáticos finales que la convierten en aflatoxina y es una buena medida de la regulación de esta ruta metabólica.

Para determinar el efecto de la luz junto con la función FlbB en la producción de ST se comparó la producción de la cepa BD215, mutante nulo *flbB* y fondo genético *veA+*,

con su correspondiente cepa *flbB* silvestre, RNKT5.1, y por otro lado, la producción de ST de las cepas con fondo genético *veA1*, independientes de luz, para lo que se utilizó la cepa nula de *flbB* BD143 y la cepa silvestre FGSC33.

La toxina producida por el hongo se extrajo siguiendo los pasos descritos en el apartado 11.1 de M&M. Se partió de cultivos sólidos de las 4 cepas previamente mencionadas incubados durante 7 días a 37°C tanto en luz como en oscuridad. De estas muestras se extrajeron discos que contenían el micelio, las esporas y parte del medio de cultivo. La extracción de la esterigmatocistina se llevó a cabo utilizando cloroformo como se explica en el apartado 11.1 de M&M y la separación de las muestras se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como solvente benceno:ácido acético glacial. Una vez tratada la placa de silica gel para su correcta visualización, se obtuvieron los resultados descritos a continuación (figura R-25).

En los ensayos realizados se observa cualitativamente que la producción de esterigmatocistina es superior, en las tres muestras analizadas en cada condición, cuando el hongo ha sido cultivado en oscuridad frente a la condición de iluminación. En cepas con fondo genético *veA*<sup>+</sup> no existe una diferencia significativa entre la ST detectada para una cepa silvestre, frente a una cepa nula de *flbB* (panel A). Sin embargo, en las cepas con fondo genético *veA1* se observa una clara disminución en los niveles de ST producidos por la cepa nula *flbB* frente a los producidos por la cepa silvestre (panel B).

Por lo tanto, FlbB se necesita para mantener la producción de esterigmatocistina en cepas con fondo genético mutante *veA1*. Está descrito que la producción de ST es mayor en cepas *veA*<sup>+</sup> respecto a las *veA1* (Stinnett *et al.*, 2007), por lo que estos resultados muestran que la influencia positiva de FlbB es sólo apreciable en ausencia de una función VeA completa.

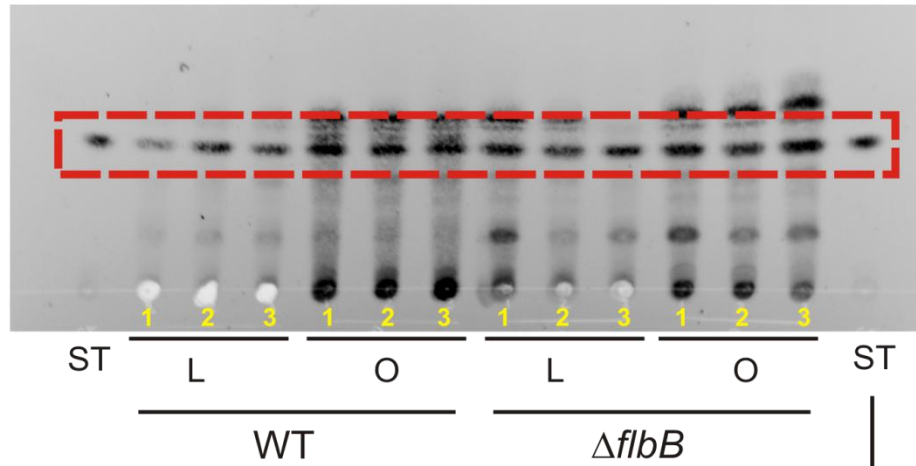
#### 5.1.2 Cuantificación de la formación de estructuras de reproducción sexual y asexual

También se estudió el efecto coordinado de FlbB y de la luz en la formación de las diferentes estructuras morfológicas de la colonia. FlbB es un factor transcripcional



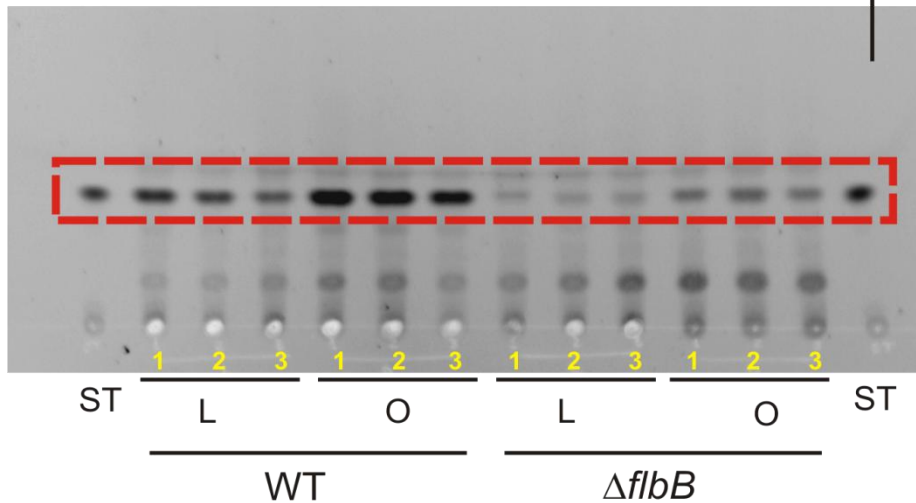
A

VeA



B

VeA1



**Fig. R-25: La producción de esterigmatocistina (ST) se reduce en un mutante  $\Delta flbB$  en el fondo genético *veA1*:** *Aspergillus nidulans* produce mayor cantidad de ST en oscuridad en una cepa silvestre y también en un mutante  $\Delta flbB$ . A) En un fondo genético *veA* silvestre no existen diferencias cualitativas significativas en la producción de esterigmatocistina entre una cepa WT y una  $\Delta flbB$ , comparando tanto la producción en condiciones de cultivo con iluminación (L) como en oscuridad (O). B) Sin embargo, en un fondo genético *veA1*, se produce una notable reducción de la producción de ST en el mutante nulo de *flbB*. Los números en la parte inferior de cada panel indican muestras independientes de cada ensayo. ST indica esterigmatocistina comercial utilizada como control de movilidad de la micotoxina producida por el hongo y cuya fórmula se incluye en el centro de la imagen.

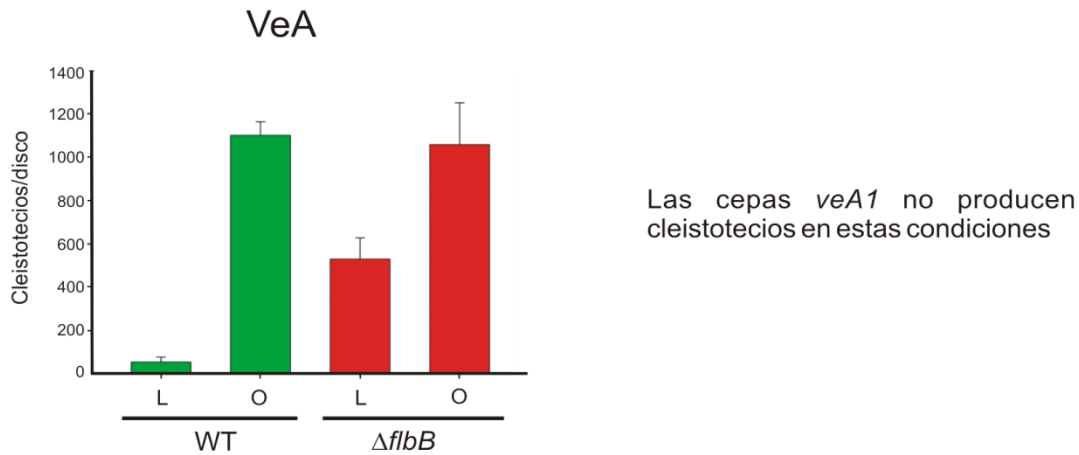
involucrado en la ruta de la reproducción asexual, pero se desconoce su influencia en la formación de dichas estructuras. Se midieron indicadores de la reproducción asexual, conidios, así como indicadores de la reproducción sexual, cleistotecios. El recuento de conidias y cleistotecios se realizó a partir de cultivos de 7 días incubados a 37°C en luz y oscuridad, igual que en el apartado anterior. Se contaron las anteriores estructuras producidas por dos cepas *flbB* WT, la *veA+* RNKT5.1 o la *veA1* FGSC33 y de dos cepas nulas de *flbB*, la *veA+* BD215 o la *veA1* BD143 (ver secciones 11.2 y 11.3 de M&M).

El gráfico de la figura R-26.A muestra la producción de cleistotecios en las cepas *veA+*. Se observa que las cepas *flbB* silvestre y  $\Delta flbB$  producen más de 1000 cleistotecios por disco en oscuridad, frente a los escasos 50 que produce como media la cepa *flbB* silvestre en presencia de luz. Se midió un notable incremento en la producción de cleistotecios por la cepa nula de *flbB* en presencia de luz superando en 10 veces a los producidos por la cepa *flbB* silvestre. Estos resultados sugieren que FlbB juega un papel inhibidor en la producción de estructuras sexuales en condiciones de luz en cepas donde existe un complejo velvet activo. La ausencia de un velvet funcional se impone a este efecto regulatorio de FlbB dado que, como se indica en la figura, las cepas con fondo genético *veA1* no producen cleistotecios en estas condiciones.

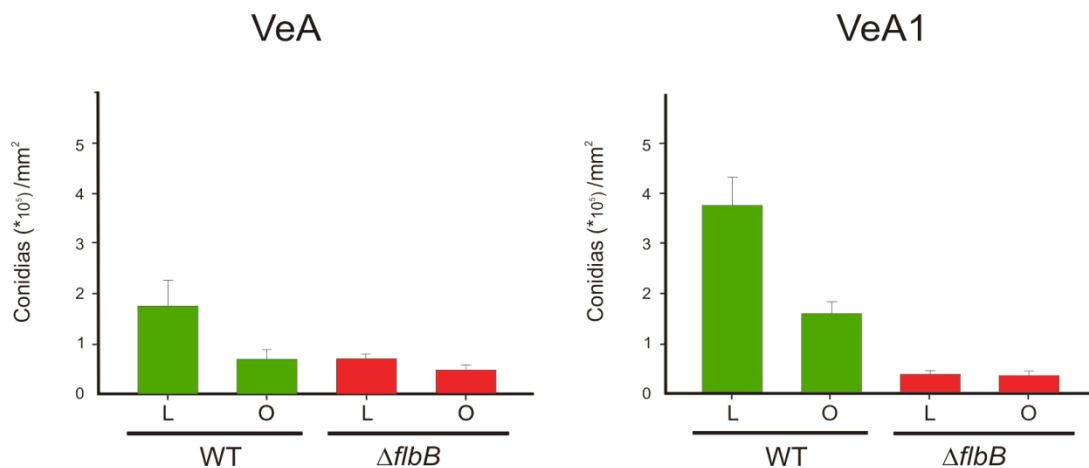
En la figura R-26.B se presentan los gráficos correspondientes a la producción de conidios por las cepas *veA+* y *veA1* en presencia o ausencia de función FlbB. En las cepas *flbB* silvestre los niveles de conidiosporas dependen de VeA, siendo superiores en el fondo *veA1*; sin embargo todavía se observa un notable efecto de la luz en dicho fondo genético. La ausencia de FlbB reduce los niveles de conidiosporas tanto en el fondo *veA+* como en el mutante *veA1* y de forma independiente de luz. Por lo tanto el alelo nulo *flbB* es epistático a velvet y a la señalización tras la estimulación por luz.

El conjunto de resultados muestra un papel dual de FlbB, siendo positivo para la producción de las estructuras de reproducción asexual, como ya se ha demostrado por estudios previos, y actuando como inhibidor del desarrollo de las estructuras reproductivas sexuales del hongo.

A

Producción de Cleistotecios

B

Producción de Conidiosporas

**Fig. R-26: Efecto de la luz y VeA en la producción de cleistotecios y conidiosporas en cepas  $\Delta flbB$ .** A) En las cepas dependientes de luz, la oscuridad favorece la producción de cleistotecios. En condiciones de luz, se produce un incremento de la producción de cleistotecios en ausencia de *flbB*. Las cepas *veA1* no son capaces de producir cleistotecios en las condiciones del experimento (7 días de incubación). B) En una cepa *veA+* silvestre, la luz favorece la producción de conidias. Sin embargo, en la cepa  $\Delta flbB$  *veA+* el número de conidias se ve reducido tanto en luz como en oscuridad. En la cepa *veA1* silvestre, el número de conidias producido es mayor que en la cepa *veA+*, siendo más alta en luz que en oscuridad. En cuanto a la cepa  $\Delta flbB$  *veA1* el número de las conidias producidas se reduce considerablemente tanto en luz como en oscuridad.

## 5.2 Oxilipinas

La colonia fúngica a lo largo de su desarrollo combina diferentes tipos celulares, desde el micelio con sus características células de crecimiento polarizado (hifas) hasta las estructuras sexuales y asexuales de reproducción. La diferenciación o mantenimiento del micelio indiferenciado depende tanto de las condiciones ambientales ya descritas (luz, emergencia al aire...) como de autorreguladores endógenos de los cuales sólo se han descrito unos pocos (Ugalde, 2006). En la introducción se menciona el trabajo previo realizado por el laboratorio al determinar las principales oxilipinas, o VOCs de 8 carbonos, que se acumulan en las conidiosporas de *A. nidulans*. Tomando como base los resultados obtenidos por la Dra. Cordobés respecto a la identificación de las oxilipinas presentes en las conidias y el efecto de sobrepoblación del inóculo (ver sección 7.2 de introducción), en este apartado quisimos profundizar en el efecto de estos metabolitos secundarios sobre la germinación de las conidiosporas, el crecimiento radial y la inducción de la conidiación en *Aspergillus nidulans*.

### 5.2.1 El 1-octen-3-ol actúa como inhibidor del crecimiento y la germinación

La germinación de la espora comienza con el incremento de su volumen de manera isotrópica antes de emitir el tubo germinativo. La Dra. Cordobés observó que concentraciones superiores a  $10^5$  conidias/ml causaban un alto nivel de inhibición del proceso de germinación en cultivos líquidos tras 11h de incubación (más del 25% de conidias no germinadas), llegando a los valores máximos en concentraciones de  $10^8$  conidias/ml (>90% sin germinar, tabla en figura R-27.A). Además de los efectos en la germinación, altas densidades de colonia en la superficie de una placa, también mostraron una inhibición en el crecimiento radial reduciéndose hasta en un 30% la velocidad del crecimiento radial, Kr (tabla en figura R-27.A).

El posible agente responsable de este efecto inhibitorio de la germinación y del crecimiento radial, fue detectado en el contenido intracelular de las conidiosporas mediante extracción de éste con solventes adecuados y posterior análisis por HPLC. El cromatograma de este análisis mostró un pico principal a los 7.6min de tiempo de retención, junto con otras dos fracciones mayoritarias con tiempos de retención  $t=6.2$  y

t=8.5min (figura R-27.B). El pico principal fue identificado como el 1-octen-3-ol, mientras que los otros dos con tiempos de retención t=6.2 y t=8.5min correspondieron al 3-octanol y la 3-octanona, respectivamente. Una vez identificado el compuesto, la Dra. Cordobés demostró que el rango de inhibición del 1-octen-3-ol se encontraba entre la concentración mínima a 0.065mM y la máxima a 11.65mM tanto con la oxilipina comercial como con la fracción purificada por HPLC que contiene el 1-octen-3-ol producido por el hongo (ver figura R-28.A).

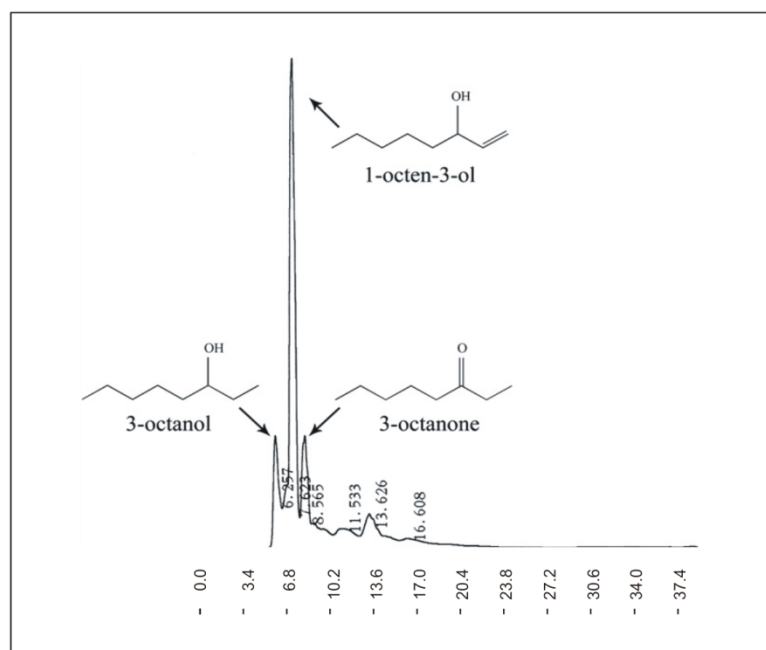
A partir de los resultados obtenidos por la Dra. Cordobés, decidimos estudiar en mayor profundidad la inhibición de la germinación en conidias expuestas al 1-octen-3-ol. Se determinó el volumen de las conidias que habían germinado (crecimiento isotrópico de la conidia) en presencia de una concentración de 4mM de 1-octen-3-ol. Esta concentración de la oxilipina fue un estándar en el trabajo realizado por (Chitarra *et al.*, 2004) y se pudo observar que en los ensayos realizados previamente daba lugar a una inhibición de aproximadamente el 50% del crecimiento radial de la colonia (figura R-28.A). En ausencia de la oxilipina prácticamente el 100% de la conidias germinaron y en 4 horas de incubación alcanzaron un volumen medio de 45  $\mu\text{m}^3$ . En ese mismo tiempo de incubación en medio conteniendo 4mM de 1-octen-3-ol el volumen de la conidia permanecía prácticamente inalterado respecto al inicio del cultivo (aproximadamente 20  $\mu\text{m}^3$ ) lo que indicaba que esta oxilipina estaba inhibiendo la germinación de la conidia desde sus fases más tempranas. El valor de este compuesto como autoinhibidor es el hecho de que tiene un efecto reversible. Cuando las esporas tratadas con 1-octen-3-ol fueron recogidas y transferidas a medio de cultivo fresco se observó que tras más de 2 horas de incubación éstas empezaron a crecer de forma isotrópica y a las 6 horas alcanzaron el volumen de las esporas del experimento control en el que no se había incluido el autoinhibidor (figura R-28.B).

Por lo tanto, se demuestra que el 1-octen-3-ol actúa como inhibidor de la germinación y que dicho efecto es reversible.

A

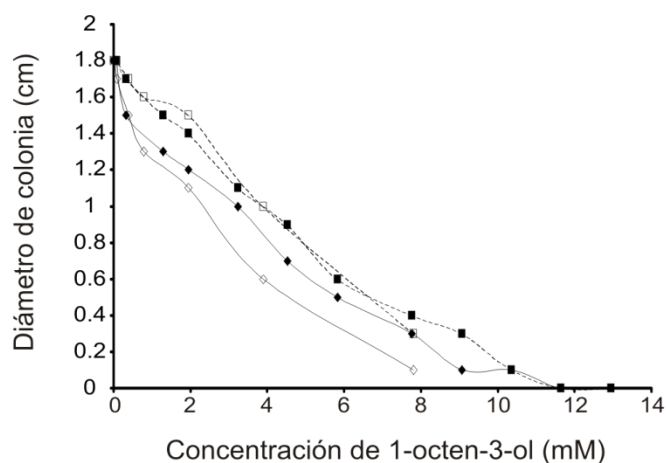
Concentración de conidias (conidia/ml)	% Germinación	Kr: velocidad de crecimiento radial ( $\mu\text{m/h}$ )
$10^3$	$91.3 \pm 7.1$	$280 \pm 31$
$10^4$	$92.5 \pm 7.4$	$283 \pm 33$
$10^5$	$83 \pm 7.0$	$260 \pm 21$
$10^6$	$72 \pm 6.1$	$204 \pm 14$
$10^7$	$17 \pm 0.3$	$195 \pm 16$
$10^8$	$8 \pm 0.3$	$189 \pm 13$

B

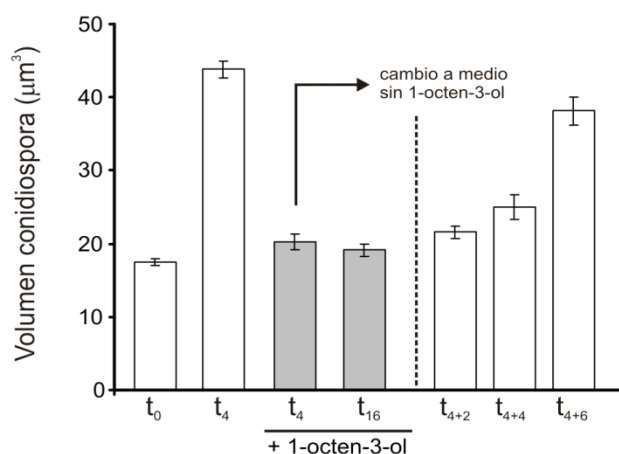


**Fig. R-27: La superpoblación de conidias provoca la inhibición de la germinación y la disminución del crecimiento de la colonia a través del 1-octen-3-ol:** A) Concentraciones superiores a  $10^5$  conidias/ml causan la inhibición de la germinación y del crecimiento de la colonia. B) Tras la purificación de los extractos obtenidos a partir de esporas de una cepa silvestre, se detectaron 3 compuestos mediante HPLC:  $t_R=6.2\text{min}$ ,  $t_R=7.6\text{min}$  y  $t_R=8.5\text{min}$ , que fueron posteriormente identificados como el 3-octanol, el 1-octen-3-ol y la 3-octanona, respectivamente. Figura modificada a partir de la tesis doctoral de S. Cordobés y publicada en Herrero-García et al, 2011.

A



B



**Fig. R-28: Concentraciones crecientes de 1-octen-3-ol causan mayor inhibición del crecimiento de la colonia, impidiendo la germinación de las esporas.** A) Patrón de inhibición del crecimiento mostrado por las cepas TTA127.4 (*veA1*) (◇,◆) y WIM126 (*veA1*) (□,■) tras haberlas expuesto a la fracción purificada del extracto proveniente de conidias (símbolo en blanco) y a 1-octen-3-ol puro (símbolo en negro) durante 40h de incubación. Figura modificada a partir de la tesis doctoral de S. Cordobés y publicada en Herrero-García et al, 2011. B) Efecto inhibitorio del crecimiento isotrópico de las conidias. La cepa RRMD3.4 (*veA1*) incrementa el volumen de la colonia tras 4h ( $t_4$ ) de incubación a 37°C en medio líquido, siendo ésta la fase de crecimiento isotrópico de la germinación. La administración de 4mM de 1-octen-3-ol impide este tipo de crecimiento ( $t_4$ , barra gris). Este efecto puede revertirse cambiando las conidias a medio fresco. En la gráfica se muestran los volúmenes de las conidias previamente incubadas durante 4h con el agente inhibidor, 2h ( $t_{4+2}$ ), 4h ( $t_{4+4}$ ) y 6h ( $t_{4+6}$ ) después del cambio de medio. Se midieron n=50 conidias en cada caso.

### 5.2.2 La oxilipina 3-octanona es la principal inductora de la conidiación

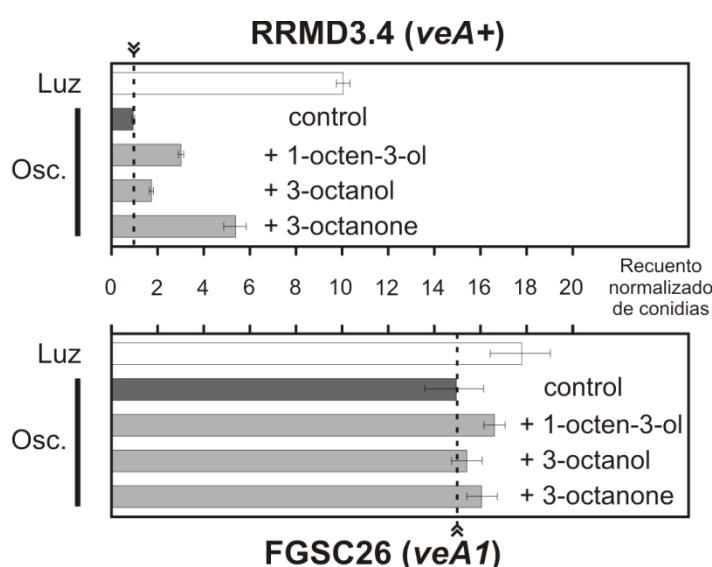
Las oxilipinas de 8 carbonos pueden causar un efecto positivo sobre la conidiación, por tanto, se estudió el efecto en *Aspergillus nidulans* utilizando la cepa RRMD3.4, *veA+* dependiente de luz, y la FGSC26, *veA1*, que esporula de manera independiente a la luz. La producción de conidias de la cepa *veA+* RRMD3.4 fue profusa en presencia de luz, mostrando un nivel reducido de la conidiación en oscuridad (panel superior figura R-29). La adición del 1-octen-3-ol y el 3-octanol causó un pequeño incremento en la esporulación del hongo en oscuridad. Sin embargo, la adición de la 3-octanona (1mg) aumentó significativamente la capacidad de esporulación del hongo en oscuridad, medida como el número de conidias producidas y normalizadas respecto al recuento de esporas en colonias sin tratar (panel superior figura R-29). En cuanto a la cepa independiente de luz *veA1* FGSC26, presentó una profusa conidiación tanto en luz como en oscuridad, sin que la adición de las oxilipinas causara ningún efecto sobre la capacidad de conidiación de la cepa (panel inferior figura R-29). El efecto de la 3-octanona se observa en las colonias crecidas sobre medio sólido. En medio líquido *A. nidulans* no esporula salvo en condiciones de estrés (Ettxebeste *et al.*, 2008; Garzia *et al.*, 2009) y añadir esta oxilipina al medio de cultivo líquido no cambia dicho patrón.

Dado que la 3-octanona es la oxilipina que tiene un efecto mayor sobre la conidiación en cepas *veA+*, los siguientes experimentos fueron realizados utilizando únicamente esta oxilipina. Para determinar a qué nivel de la ruta de la conidiación podría estar mediando su acción la 3-octanona se utilizaron cepas portadoras de alelos nulos de los genes pertenecientes a la ruta UDA y a su efector final, *brlA*. En primer lugar, se analizó el mutante nulo de *brlA* (BD400) y se observó que la adición de 3-octanona no alteraba en absoluto su fenotipo completamente *fluffy*. Corriente arriba de *brlA*, se encuentran los activadores tempranos de la conidiación, UDA. Cuando se administró 1mg de 3-octanona a los mutantes nulos de los genes de la ruta UDA, *flbB*, *flbC*, *flbD* y *flbE* (cepas BD215, BD239, BD276 y BD508, respectivamente, ver tabla de cepas) que presentan un defecto en la conidiación, se observó que la 3-octanona fue incapaz de promover la conidiación en ninguno de ellos manteniéndose el fenotipo *fluffy* habitual de



estos mutantes. También se evaluó la necesidad del factor FluG en este proceso de señalización por la oxilipina. Así, se añadió 3-octanona a la cepa  $\Delta fluG veA+$  (BD234), pero ésta no produjo ningún cambio en el fenotipo aconidial de esta cepa.

Del conjunto de resultados, se concluye que la acción positiva sobre la conidiación de la 3-octanona se opone al efecto negativo mediado por VeA; sin embargo se precisa de la integridad de la ruta UDA y de otros factores tan necesarios para la señalización de la conidiación como FluG o BrlA para que la oxilipina 3-octanona medie su acción inductora.



**Fig. R-29: La 3-octanona causa la conidiación de cepas *veA+* en oscuridad.** Las cepas RRMD3.4 (*veA+*) y FGSC26 (*veA1*) fueron cultivadas con luz (barra blanca) o en oscuridad (barra negra). En ausencia de luz también se midió la producción de esporas cuando se añadió al medio 1 mg de 1-octen-3-ol, de 3-octanol o de 3-octanona (barras grises). El recuento de esporas se llevó a cabo como se detalla en el apartado 11.3 de M&M de esta tesis.

## **DISCUSIÓN**



## **1.- Formación del Complejo Apical**

Una parte sustancial de esta tesis se ha enfocado al análisis en profundidad de los elementos necesarios para la formación del Complejo Apical como un elemento clave señalizador perteneciente a la ruta activadora (UDA) de la ruta central del desarrollo de los conidióforos (CDP). El estudio de la localización celular de los diferentes factores UDA mediante etiquetado con proteínas fluorescentes, permitió determinar que los únicos Flb-s que se acumulan en la punta de la hifa son FlbB y FlbE. FlbA tiene una localización no definida a lo largo del citoplasma, mientras que FlbC y FlbD muestran acumulación nuclear de acuerdo con su función como factores transcripcionales. Además de la colocalización de FlbB y FlbE, experimentos previos proporcionaron evidencia de la relación funcional entre estas dos proteínas. Por un lado, los datos genéticos indicaban que ambas proteínas debían tener una función similar dado que los mutantes de pérdida de función o los nulos tenían un fenotipo de pérdida de desarrollo de estructuras de reproducción asexual prácticamente idéntico (Etxebeste *et al.*, 2008; Garzia *et al.*, 2009). A nivel celular se observó que la ausencia de FlbB causa la pérdida de localización apical de FlbE, y de manera similar FlbB se deslocaliza en una cepa nula *flbE* dispersándose por toda la célula. Por otro lado, profundizando en la localización apical de FlbB y FlbE se había demostrado la proximidad física entre ambas mediante la técnica de complementación bimolecular de fluorescencia. Todos estos resultados sugerían la existencia de un complejo formado entre FlbB y FlbE, al que se le ha denominado Complejo Apical y que debe ser una parte esencial del mecanismo señalizador del CDP.

Mediante ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro* se ha demostrado la formación de un complejo FlbB-FlbE. En experimentos de “pull-down” se enfrentó una forma etiquetada de FlbB expresada en *E. coli* con un extracto proteico de *A. nidulans* que expresaba FlbE también etiquetado. La proteína FlbE endógena se detectó en el contenido de las fracciones retenidas con la proteína FlbB de origen bacteriano. Los intentos para detectar esta misma interacción en ensayos en los que se utilizó FlbE expresado en bacteria enfrentado al FlbB endógeno fueron infructuosos. Entre los escenarios posibles se hipotetizó la necesidad de una modificación en FlbE que esté

ausente en la proteína de origen bacteriano y que se precise para la formación del complejo FlbB-FlbE. No se ha profundizado en este aspecto y se continuó el análisis de la interacción entre FlbB y FlbE tomando como base el primer abordaje experimental.

La detección de la interacción entre GST-FlbB y FlbE-GFP ha permitido investigar las regiones implicadas. Con ese objetivo, realizamos un proceso de deleciones seriadas de cada una de las regiones conservadas o sobre las que se ha hipotetizado una función. En este trabajo se tomó como referencia tanto el análisis bioinformático exhaustivo que se realizó en el laboratorio (Cortese *et al.*, 2011) así como los datos genéticos procedentes de los mutantes de pérdida de función en FlbB (Etxebeste *et al.*, 2008).

Las aproximaciones informáticas predecían que la región A de FlbB, residuos 198-203, estaba conservada únicamente en los alineamientos de genomas con proteínas similares a FlbB y a FlbE, denominados “FlbB + FlbE”, por lo que se le atribuyó una función como posible región interactora con FlbE. Sin embargo, ensayos de “pull-down” en los que se había eliminado dicha región seguían mostrando una banda de interacción entre ambas proteínas, por lo que se descartó esa función para la región A de FlbB. Este abordaje informático resultó infructuoso, por lo que los siguientes experimentos se llevaron a cabo desde una aproximación bioquímica.

Se comenzó este estudio en FlbB eliminando cada una de las regiones identificadas desde el extremo carboxilo terminal, tratando de mimetizar en primer lugar las mutaciones de los mutantes clásicos BD11 y BD12 de FlbB, que expresan proteínas truncadas en los residuos 305 y 267, respectivamente. Las diferentes formas truncadas en su extremo C-terminal mantenían la interacción con el FlbE endógeno. Se continuó disminuyendo el tamaño de la proteína de fusión hasta que sólo contuvo el dominio de unión a DNA. La proteína de fusión GST-FlbB 67-140 contiene el dominio bZIP e interacciona con FlbE. No se ha investigado en más detalle los residuos específicamente involucrados dentro de esta región. Sin embargo, sí se estudió la posibilidad de una interacción entre una forma FlbB truncada que esencialmente carecía del bZIP, GST-FlbB 115-426, y FlbE. A pesar de la gran estabilidad y facilidad de manejo de esta forma de FlbB que permitió incluir elevadas cantidades de dicha proteína en el ensayo, no se pudo

detectar una interacción con FlbE, por lo que se concluyó que el dominio bZIP de FlbB es suficiente y necesario para mantener dicha interacción. No obstante, la existencia de esta interacción no explica por sí sola la formación del complejo apical, dado que truncamientos tempranos del extremo C-terminal afectan a la formación de éste. Por lo tanto se sugiere la intervención de, al menos, un mecanismo adicional a la interacción con FlbE, el cual se discute más adelante en esta sección.

Los factores transcripcionales tipo bZIP como FlbB requieren de la formación de dímeros para poder unirse al DNA y desempeñar su función, por eso, investigamos la interacción FlbB-FlbB mediante la misma técnica. Así, hemos descubierto que FlbB, en su forma completa FlbB 1-426, es capaz de formar dímeros consigo mismo. El dominio bZIP es necesario para dicha dimerización puesto que una proteína truncada por el extremo N-terminal que comprende todas las regiones conservadas de FlbB a excepción del bZIP, residuos 115-426, no es capaz de interactuar con el FlbB endógeno. Sin embargo, en este caso, este dominio no resulta suficiente para la interacción FlbB-FlbB, ya que el FlbB endógeno etiquetado, FlbB-HA, no está presente en la fracción retenida por la fusión GST-FlbB 67-140. En cambio, al incluirse los residuos comprendidos hasta el aminoácido 290 sí que se detecta la interacción. Este resultado guarda similitud con los estudios realizados con las proteínas C/EBP $\beta$  (Tahirov *et al.*, 2002) y ZEBRA (Petosa *et al.*, 2006) en las que regiones adyacentes al dominio bZIP pueden estar involucradas en interacciones proteína-proteína. Estos resultados evidencian un posible papel de las regiones A y B en la formación de homodímeros o, como se discute más abajo, en la formación de heterodímeros con otros elementos, incluidos factores bZIP.

La dimerización entre GST-FlbB y FlbB-HA planteó la duda sobre la implicación de esta interacción en la formación del Complejo Apical. Para descubrir si el FlbB endógeno podía estar mediando en la interacción GST-FlbB/FlbE-GFP, se realizó una nueva serie de experimentos de “pull-down” utilizando esta vez los extractos de una cepa  $\Delta flbB flbE-GFP$ . Estos ensayos mostraron los mismos resultados que los obtenidos anteriormente, demostrando que la interacción entre GST-FlbB y FlbE-GFP no está mediada por el FlbB endógeno.

A pesar de la probada importancia del dominio bZIP de FlbB en la interacción con FlbE, su presencia no garantiza la formación del Complejo Apical, ya que existe otro elemento clave implicado: la región carboxilo terminal de FlbB. Experimentos en los que se ha analizado la localización celular de truncamientos en el carboxilo terminal de FlbB, han mostrado su pérdida de acumulación en la punta de la hifa manteniéndose la nuclear. Con el objetivo de entender esta pérdida de localización apical se profundizó en el análisis del extremo carboxilo terminal de FlbB. De este modo, se advirtió la presencia de 6 cisteínas que estaban muy conservadas en los genomas de los 9 Eurotiales más cercanos a *A. nidulans*. Estas cisteínas podrían ser responsables de modificaciones postraduccionales de FlbB que regularían su activación y/o su localización celular.

Como el truncamiento de FlbB que perdía la localización de la punta comprendía los residuos 1-361, las cisteínas causantes de ello debían encontrarse fuera de estos residuos. Los estudios bioinformáticos afianzaban esta conclusión y mostraban que la cisteína C382 estaba conservada entre los genomas de las 40 Pezizomicotinas estudiadas y que la C397 sólo se encontraba en los genomas de la orden Eurotiales. La sustitución de cada una de las cisteínas por alaninas dio lugar a dos cepas mutantes con fenotipos bien diferenciados: la cepa que expresa FlbB<sup>C382A</sup> mostró un fenotipo completamente aconidial, similar al de una cepa portadora de un alelo nulo de *flbB*, mientras que la cepa que expresa la forma mutante FlbB<sup>C397A</sup> mostró un fenotipo indistinguible del de la cepa silvestre. El análisis de la localización de la proteína FlbB<sup>C382A</sup> en condiciones que permiten su detección, mostró una pérdida de localización de FlbB de la punta de la hifa, con un patrón similar al obtenido en la proteína truncada en el residuo 361, por lo que se deduce que la distribución del truncamiento puede deberse principalmente a la ausencia de la cisteína 382.

¿Qué papel pueden tener estas cisteínas en la señalización de FlbB y la formación del Complejo Apical? Es posible que la cisteína 382 de FlbB esté implicada en interacciones intramoleculares a través de la formación de puentes disulfuro con otra cisteína. La regulación de la activación de proteínas tras la formación de puentes disulfuro entre sus cisteínas ya ha sido previamente descrita para la proteína Pap-1 de *S. pombe*

(Castillo *et al.*, 2002). En esta proteína las cisteínas de la región carboxilo terminal pueden formar puentes disulfuro, proceso tras el cual se produce la activación funcional de Pap-1, dado que ocultan la señal de exportación nuclear acumulándose así en el núcleo para ejercer su papel como factor transcripcional. El extremo C-terminal donde se encuentran estas cisteínas en FlbB guarda gran similitud con el descrito para Pap-1, por lo que se hipotetiza que dicho proceso puede tener lugar también en FlbB.

Las aproximaciones informáticas muestran que la cisteína más conservada entre las 40 especies analizadas del subfilo Pezizomicotina es, además de la C382, la cisteína 272 (Cortese *et al.*, 2011), por lo que podría interaccionar con ella. Es posible que el plegamiento de la proteína FlbB facilite la formación de estos puentes y que en ausencia de alguna de las dos cisteínas desaparezcan, cambiando la conformación de la proteína. Este cambio de conformación podría ser la causa del cambio de localización celular de FlbB. Futuros trabajos enfocados a la sustitución puntual de la cisteína 272 permitirían descubrir si la mutación en esta cisteína causa los mismos efectos en el fenotipo y la localización que la sustitución de la C382.

En segundo lugar, se considera importante el papel que juegan las cisteínas en la asociación de proteínas a membranas tras la modificación con diferentes grupos funcionales. De esta forma, FlbB podría asociarse a membranas u orgánulos membranosos, como vesículas, que abundan en el *Spitzenkörper*. Las cisteínas pueden ser modificadas mediante diversos procesos de modificación postraduccional como son la prenilación y la palmitoilación (Basu, 2004; Casey and Seabra, 1996). La prenilación consiste en la adición de un grupo hidrofóbico a una proteína donde los grupos prenilos facilitan el anclaje a membranas. Estos grupos también son importantes en la interacción proteína-proteína. Uno de los ejemplos mejor estudiados es el de las proteínas Rab, cuya prenilación es clave para la regulación del transporte vesicular en las rutas de endocitosis y exocitosis (revisado en (Casey and Seabra, 1996)). La prenilación implica la unión del grupo farnesilo o geranilgeranilo a la cisteína C-terminal de la proteína. Habitualmente, las proteínas prenilables tienen alguno de los siguientes patrones de distribución de cisteínas en el extremo C-terminal: -CXXX, -CXC, o -CC. Las búsquedas *in silico* utilizando



el software (<http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/>) no predicen sitios de prenilación para FlbB. Además, estas dianas suelen estar localizadas muy próximas al final de la proteína y esta situación no ocurre en FlbB. La palmitoilación en cambio, es la unión covalente de ácidos grasos como el ácido palmítico a cisteínas. La palmitoilación incrementa la hidrofobicidad de las proteínas y contribuye a su unión a membranas. También pueden modular la interacción proteína-proteína (Basu, 2004). A diferencia de la prenilación, la palmitoilación suele ser un proceso reversible y existen varios ejemplos de proteínas susceptibles de ser palmitoiladas, entre ellas la H-Ras y N-Ras, pertenecientes a la familia Ras (Glomset *et al.*, 1990).

En un primer análisis sobre una posible señalización de FlbB mediante un proceso de palmitoilación se estudió el efecto del 2-bromopalmitato (2-BP). Este compuesto es un conocido inhibidor de la palmitoilación ampliamente utilizado y cuyo efecto se ha descrito en diferentes proteínas (Webb *et al.*, 2000). Actúa como un inhibidor general de la incorporación del palmitato, convirtiéndose en 2-BP-CoA dentro de la célula, pero el mecanismo mediante el cual impide la palmitoilación es aún desconocido (Resh, 2006). Se ensayó el efecto del 2-bromopalmitato en un rango de concentraciones de 1-50  $\mu$ M, como en (Fortwendel *et al.*, 2012) en la localización subcelular de FlbB-GFP sin que se observase cambio alguno. El resultado negativo motivó que no se profundizara en este aspecto y por ello no se cita en la sección de resultados.

La localización del complejo apical podría estar sustentada por dominios transmembrana. Existe una familia de factores de transcripción tipo bZIP implicados en procesos de desarrollo y respuesta a estrés que están anclados a membranas. En (Chen *et al.*, 2008) se detallan algunos de estos factores en *Arabidopsis thaliana* que supeditan su función a una proteólisis a partir de la cual se activan. La estructura de estos factores incluye un dominio transmembrana responsable del anclaje a la membrana y un dominio citosólico que contiene la función transcripcional. Sin embargo, los resultados obtenidos con FlbB no parecen sustentar este proceso. En primer lugar, no se predicen dominios transmembrana en FlbB a través de los diferentes métodos bioinformáticos disponibles en la red, como TMPred: ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)). En

segundo lugar, el etiquetado de la proteína por el C- y el N- terminal debería mostrar diferentes patrones de bandas en caso de una señalización mediante proteólisis regulada, y esto no se observa en FlbB. Por último, si la forma proteolizada fuera la forma activa de FlbB, ésta debería ir al núcleo y cumplir allí su función. Así, las formas mutantes de FlbB que careciesen de la región C-terminal resultarían en ganancias de función, como se ha descrito por ejemplo, en el factor transcripcional PacC (Tilburn *et al.*, 1995). Sin embargo, mutantes como BD11 o BD12, truncamientos en los residuos 305 y 267, respectivamente, son pérdidas de función de FlbB. Además, en los fraccionamientos subcelulares no se detecta una acumulación preferente de estas supuestas formas truncadas de FlbB en la fracción nuclear, por lo que queda descartado que en el extremo C-terminal de FlbB exista un mecanismo regulatorio de la localización celular como el que se describe aquí para otros bZIP.

El otro componente del Complejo Apical, FlbE, carece de cisteínas en su estructura primaria, por lo que no es posible hipotetizar una interacción con FlbB mediante mecanismos similares a los citados anteriormente. Tampoco es posible predecir dominios transmembrana en su secuencia. La información todavía es escasa y se limita al análisis de los mutantes de pérdida de función aislados durante el proceso de etiquetado con GFP (Garzia *et al.*, 2009). Dos de estos alelos mutantes son *flbE102* y *flbE103*, que codifican para proteínas con una sustitución puntual, la S120P y A131V, respectivamente. Estos mutantes hipofuncionales deslocalizan a FlbE, perdiendo la interacción con FlbB. La mutación A131V reside en una región altamente conservada entre los 9 hongos Eurotiales que poseen esta proteína, mientras que la mutación S120P se sitúa cerca de la anterior en una región considerada como *linker* donde la sustitución de la serina por una prolina podría afectar al plegamiento de FlbE. Estos posibles cambios conformacionales podrían causar la pérdida de la interacción entre esas formas mutantes de FlbE y FlbB.

Este trabajo establece las bases para el futuro estudio molecular de la interacción entre FlbB y FlbE, a través del bZIP, y el modelo de trabajo para determinar los elementos o mecanismos detrás de la formación del Complejo Apical que media el proceso de diferenciación asexual.

## **2.- Regulación de la actividad de FlbB**

FlbB es un factor transcripcional con un dominio de unión a DNA tipo bZIP cuya secuencia tiene un alto nivel de conservación con la de la familia de factores AP-1, ampliamente documentado en eucariotas superiores. Los factores AP-1 están involucrados en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En hongos se ha descrito su implicación en respuesta a estrés oxidativo (Asano *et al.*, 2007;Castillo *et al.*, 2002). En este apartado se pretende ahondar en los mecanismos de regulación de FlbB y sus dianas de unión.

### **2.1 Posibilidad de la formación de complejos multiproteicos para la unión de FlbB a los promotores bajo su regulación**

La capacidad de unión a DNA del dominio bZIP de FlbB ya ha sido demostrada en (Etxebeste *et al.*, 2009). Este tipo de dominio de unión a DNA suele formar complejos multiproteicos para unirse a los promotores de los genes que regulan. Dicho complejo puede causar un cambio en la disposición del DNA incrementando así la especificidad de unión proteína-DNA (revisado en (Tsukada *et al.*, 2011)).

Los experimentos realizados con el dominio de unión a DNA de FlbB parecen apoyar la existencia de este tipo de asociación. FlbB presenta un motivo conservado entre los bZIP de la familia AP-1 en otros hongos filamentosos en el que los residuos encargados de contactar directamente con las bases nitrogenadas del DNA son NXXAQXXHR, residuos 86-94. Este motivo se conserva en los bZIP de la familia AP-1 en *S. pombe*, *S. cerevisiae* y en el propio *A. nidulans* (NapA) salvo en la histidina de la posición 93, la cual es sustituida por una fenilalanina en los homólogos de FlbB. Sin embargo, estos residuos no parecen ser los únicos implicados en esta función, puesto que mutaciones puntuales fuera de esta región conservada pueden reducir la capacidad de unión a DNA del bZIP de FlbB. Este es el caso de la mutación G70R. Esta sustitución puntual causada por el alelo *flbB100* muestra un fenotipo aconidial y reduce la capacidad de unión del bZIP a las secuencias diana (Etxebeste *et al.*, 2009). La proteína bZIP HapX de *A. nidulans*, homóloga del FT

Hap4p de *S. cerevisiae*, tiene un residuo de glicina conservado en posición muy cercana al dominio bZIP. Esta glicina tiene un papel principal en la formación del complejo entre HapX y las otras proteínas Hap (HapB/C/E) en *A. nidulans* (Tanaka *et al.*, 2002). Su modificación impide el reclutamiento de HapX al complejo y su consecuente unión a la secuencia de regulación (McNabb and Pinto, 2005). De manera similar a la glicina de HapX, la glicina 70 de FlbB podría también ser responsable del reclutamiento de FlbB a un complejo multiproteico para ganar especificidad respecto a la unión a DNA.

Algunos complejos proteicos reguladores descritos en eucariotas superiores son los formados entre un bZIP y un segundo tipo de factor transcripcional. En *Arabidopsis thaliana* el factor bZIP Perianthia es regulado por otro factor de transcripción, Wuschel, que tiene un homeodominio, y ambos conjuntamente activan la expresión de un tercer factor, Agamous (Maier *et al.*, 2009). Este mecanismo de actuación conjunta muestra una similitud con la activación de *brlA* en *A. nidulans* por parte de FlbB y FlbD (Garzia *et al.*, 2010). En células eucariotas existe una asociación funcional entre factores tipo bZIP y los de tipo c-Myb. Uno de estos sistemas reguladores coordinados mejor documentados es la interacción entre c-Myb y C/EBP $\beta$  que regula la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas. En este complejo el dominio de unión a DNA del c-Myb interacciona con la región adyacente al bZIP de C/EBP $\beta$ , localizada en su extremo C-terminal. Esta región, que comprende 19 aminoácidos, es una región muy conservada en todos los FT de la familia C/EBP y es importante para la interacción proteína-proteína pero no es imprescindible para la dimerización de C/EBP (Tahirov *et al.*, 2002). También se ha descrito la acción conjunta de estos dos factores de transcripción sobre el promotor *mim-1*. Para ello, el homodímero de C/EBP $\beta$  se une de manera asimétrica al c-Myb, de forma que uno de los monómeros muestra un menor contacto con él, el cual a su vez interacciona con el DNA. Esta distribución de los bZIP y el c-Myb estabiliza un bucle en el DNA permitiendo que cada factor se una a cada lado del DNA a una distancia de tan solo 80pb.

El estudio de la regulación de la expresión de *brlA*, el gen maestro del desarrollo asexual en *A. nidulans*, ha mostrado un sistema regulatorio similar. En este caso existe una asociación entre FlbB y el c-Myb FlbD. Ambos factores unen a dianas próximas en una región concreta del promotor de *brlA* (Garzia *et al.*, 2010). Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina sugerían que este reconocimiento de secuencia dependía de un efecto combinado de la unión de ambos factores. En esta tesis se demuestra la formación de un complejo regulador entre FlbB y FlbD mediante ensayos de “pull-down”. Experimentos futuros podrían centrarse en determinar la base molecular de la formación del complejo FlbB/FlbD, en particular prestando atención al dominio bZIP de FlbB y el dominio c-Myb de FlbD dado que, como se detalla arriba, en otros complejos bZIP/c-Myb estudiados ciertos residuos de estos dominios son necesarios para que se forme el complejo transcripcional (Tahirov *et al.*, 2002).

Finalmente, existen ejemplos en células humanas de factores de transcripción tipo bZIP cuya función reguladora depende de la naturaleza de los dímeros que forman. Los FT FOS forman heterodímeros con los JUN, mientras que éstos pueden además formar homodímeros. Dependiendo de la composición del dímero, éste puede ejercer una regulación positiva, una negativa o incluso los dos tipos de regulación (Zenz *et al.*, 2008). Para FlbB se ha descrito su homodimerización, pero se desconoce su capacidad de formar heterodímeros con otros bZIP. Teniendo en cuenta la elevada similitud del bZIP de FlbB con los bZIP de la familia AP-1 (mostrada en la figura 5 de la introducción) podría ser factible la formación de heterodímeros, aunque esta hipótesis debe ser confirmada experimentalmente. La construcción en nuestro grupo de los mutantes nulos de los FT tipo bZIP Jb1A y el codificado por el gen AN8772.3, FT que las predicciones informáticas apuntaban como posibles *partners* de FlbB, no mostraron un fenotipo aconidial (sin publicar), como tampoco lo hizo el mutante nulo  $\Delta$ NapA descrito por (Asano *et al.*, 2007). Aun así, este hecho no descarta la dimerización de FlbB con ellos, ya que su función podría no estar relacionada con el desarrollo asexual. Un reciente estudio con otros factores de transcripción (NapA, RsmA, ZipA, ZipB y ZipC) de tipo bZIP en *A. nidulans*, ha demostrado la capacidad de estos factores para formar heterodímeros (Yin *et al.*, 2012).

## 2.2 Dianas de unión de FlbB

### 2.2.1 La autorregulación transcripcional de FlbB

Un importante resultado del trabajo realizado en esta tesis doctoral ha sido la demostración de la regulación positiva que ejerce FlbB sobre su propia transcripción, es decir, la autorregulación de FlbB. Un sistema regulador similar fue sugerido para la expresión del factor bZIP de ABI5 de *Arabidopsis* implicado en la respuesta a ácido abscísico (Finkelstein and Lynch, 2000). El conjunto de resultados obtenidos tras el análisis de la localización celular de formas truncadas de FlbB apuntaba hacia la existencia de este mecanismo regulador transcripcional. Tanto los mutantes truncados como ciertos mutantes puntuales en FlbB mostraban un fenotipo aconidial indistinguible del alelo nulo. Los niveles de proteína mutante eran prácticamente indetectables y explicaba los bajos niveles de fluorescencia de las formas mutantes etiquetadas. Los análisis por “*Northern-blot*” de los niveles de transcrito demostraban que en dichos fondos mutantes apenas existía transcripción de *flbB*. Además, cuando se estudió mediante genética en reverso a los alelos que producían truncamientos de FlbB, estas proteínas mutantes sólo fueron detectables mediante microscopía y “*Western-blot*” cuando había múltiples copias de la construcción que producía la proteína mutante. Todos estos resultados sugerían que la falta de detección de la proteína y del transcrito se debía a un fenómeno de autorregulación. Para obtener una evidencia definitiva de ello, se generó un nuevo alelo mutante en el que el codón iniciador fue sustituido por uno que codificaba para isoleucina. El fenotipo aconidial de la cepa portadora de esta mutación y la desaparición del pico de expresión del transcrito de *flbB* a las 6h, demostraron la regulación de la expresión de FlbB por su propia actividad reguladora.

Lógicamente, para que esta autorregulación tenga lugar es necesaria la presencia de dianas de FlbB en su propio promotor. Se buscaron secuencias diana consenso para factores de transcripción bZIP de la familia AP-1, como la secuencia denominada PLD, palindrómica, 5'-TTACGTAA (secuencia PLD) o la definida experimentalmente, AP-1, 5'-TTAGTCA (Fujii *et al.*, 2000). Se permitió una variabilidad de 2 bases y se tuvieron en cuenta las regiones en los flancos a la hora de hacer la predicción. Así, se encontró una

posible diana en la posición -424 a -432, identificada como 5'-TTACCTAT. Al analizar sus regiones flanqueantes se encontró la secuencia 5'-ACTTTACCTATAAC, muy parecida a la descrita para la secuencia PLD: 5'-AGTTTACGTAATCT (Toda *et al.*, 1992). Por lo tanto, postulamos que este sitio encontrado en el promotor del propio *flbB* podría ser una diana potencial que puede dar lugar a su autorregulación.

### 2.2.2 El papel regulador del c-Myb FlbD

El factor transcripcional FlbD, otro de los participantes en la ruta UDA, también es activado por FlbB y ambos conjuntamente regulan la expresión del gen maestro de la conidiación *brlA* (Garzia *et al.*, 2010). Existen dos dianas consenso para la unión de FlbB en el promotor de *flbD* entre las posiciones -717 y -711 y entre -499 y -493, las cuales han sido comprobadas mediante ensayos de movilidad electroforética (EMSA) y ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). De forma similar, se ha analizado una diana de FlbB, entre dos dianas de FlbD en el promotor de *brlA* (Garzia *et al.*, 2010).

La regulación conjunta desarrollada por estos dos factores de transcripción, se vio reforzada cuando a lo largo de este trabajo demostramos la interacción entre FlbB y FlbD, permitiéndonos definir la existencia de un complejo regulador. A pesar de no haber podido localizar este complejo mediante la técnica de complementación bimolecular de fluorescencia, éste debería encontrarse en el núcleo más apical, puesto que esa es la localización en la que ambas proteínas coinciden.

El trabajo realizado durante esta tesis ha permitido profundizar también en la relación entre estos dos factores poniendo de manifiesto que FlbD juega un papel sobre la regulación de la transcripción de FlbB, además de ser necesario para la acumulación nuclear de FlbB. El efecto regulador de FlbD sobre la expresión de *flbB* se observa en la desaparición del pico de la expresión del transcrito de *flbB* a las 6h tras la inducción del desarrollo asexual en ausencia de FlbD. Este incremento característico del nivel de expresión del transcrito de *flbB* podría deberse a una retroalimentación entre FlbB y FlbD, de manera que FlbB es capaz de activarse a sí mismo y a *flbD*, mientras que FlbD también influye positivamente en la expresión de *flbB*. Resultaría interesante que futuros experimentos pudieran profundizar en la posible regulación de *flbB* por parte de FlbD, ya

que ensayos *in silico* predicen diferentes dianas de unión de FlbD en el promotor de *flbB*: se encuentran dos dianas 5'-CAGTTG, en las posiciones -811 a -805 y -406 a -412 (complementaria) y una diana 5'-CCGTTG en la posición -219 a -225 (complementaria), secuencias diana para FlbD definidas en (Garzia *et al.*, 2010).

La función de FlbD parece no limitarse a la regulación de la expresión de *brlA* o *flbB*, dado que también tiene un efecto sobre la localización de FlbB. Una revisión de los resultados obtenidos anteriormente, reveló una evidente disminución de acumulación nuclear de FlbB en ausencia de FlbD. De hecho, en la mayoría de las hifas analizadas no pudimos detectar a FlbB en el núcleo más apical, aunque sí se observaba en la punta de la hifa. Sólo en un número muy reducido de las hifas estudiadas pudo detectarse a FlbB en el núcleo. Este resultado abre la posibilidad de que FlbD sea responsable del reclutamiento de FlbB al núcleo mediante una señal de localización nuclear (NLS) funcional. A pesar de que FlbB no tiene una NLS clásica reconocida por la importina  $\alpha$ , se ha definido como tal la región inmediatamente anterior al dominio de unión a DNA, residuos K57-K72, ya que guarda cierta similitud con las NLS bipartitas clásicas, la secuencia KK-X(8)-KRRG (Etxebeste, 2008) frente al consenso KR/KK-X(10-12)-KRRK descrito en (Fontes *et al.*, 2003). Si la NLS de FlbD fuera reconocida de forma más efectiva que la de FlbB, en presencia de ambas proteínas podría imponer su función a la NLS de FlbB, reclutando a las dos proteínas al núcleo de forma simultánea. Este tipo de transporte tendría un referente en el transporte nuclear de VelB por el complejo VeA/KapA (Bayram *et al.*, 2008). Sin embargo, en ausencia de FlbD, FlbB utilizaría su propia señal, menos efectiva, explicando así el reducido número de hifas que muestran acumulación nuclear en la cepa  $\Delta flbD flbB-GFP$ . Ese efecto, además, podría ser la causa de la pérdida del incremento de la expresión de *flbB* a las 6 horas de inducción de la conidiación. La construcción de una cepa  $\Delta flbD gpdA-GFP-flbB$  podría aportar datos interesantes a este respecto, desvelando si se mantiene la localización apical de FlbB o si la sobreexpresión provoca su acumulación también en los núcleos.



### 2.2.3 La regulación negativa de la oxidoreductasa GmcA involucrada en conidiación

En los apartados anteriores se ha descrito el papel regulador de FlbB como un activador transcripcional, pero este factor también puede actuar como represor. Ejerce su función como tal sobre la oxidorreductasa GmcA, una enzima que también está involucrada en el proceso de conidiación.

El descubrimiento de la enzima GmcA tuvo lugar a partir del análisis comparativo de patrones en geles desnaturalizantes bidimensionales de proteínas expresadas en una cepa silvestre y una cepa nula para *flbB*. La delección del gen *gmcA* causa una reducción en la conidiación de la cepa y por este motivo se ha asociado la actividad de esta oxidorreductasa a la señalización de este proceso de desarrollo. El incremento de expresión de este gen en ausencia de FlbB indica que este factor transcripcional ejerce un papel negativo. La acción directa de FlbB sobre *gmcA* no se ha demostrado y surgen dudas sobre este posible mecanismo regulador dado que no se han podido identificar dianas consenso de FlbB en el promotor de *gmcA*. El mecanismo regulador que actúa sobre *gmcA* debe ser complejo dado que la fuente de nitrógeno y el pH del medio, quizás de forma conjunta, modulan su expresión y pueden también cambiar el fenotipo aconidial al que da lugar el alelo nulo de *gmcA*.

Así, la cepa  $\Delta gmcA$  crecida en condiciones de cultivo alcalinas muestra un fenotipo más aconidial respecto a condiciones ácidas. Este mismo efecto se observa cuando el medio contiene nitrato en lugar de amonio como fuente principal de nitrógeno. Sin embargo, lo más interesante es que dicho fenotipo aconidial se relaciona directamente con la expresión de *brlA*. La relación funcional entre FlbB y GmcA es todavía desconocida pero la cepa  $\Delta flbB \Delta gmcA$  muestra un fenotipo aditivo, sugiriendo que *flbB* y *gmcA* no están situados en la misma ruta lineal. Por lo tanto, en una cepa silvestre, FlbB regula negativamente a *gmcA*, haciendo que este último no se exprese en condiciones ácidas y que reduzca su nivel de expresión en condiciones alcalinas. GmcA debe activar por tanto a *brlA* de manera independiente a FlbB, aunque su grado de participación en la ruta depende en gran medida de las condiciones de cultivo.

### 2.3 Papel de FlbB en la regulación del ciclo sexual

FlbB ejerce también su labor reguladora sobre el equilibrio entre el desarrollo del ciclo sexual y del ciclo asexual. El recuento de estructuras sexuales en condiciones de luz y de oscuridad sirvió para medir el efecto de FlbB sobre el ciclo sexual. Los resultados de esta investigación muestran una alta producción de cleistotecios en oscuridad tanto en presencia como en ausencia de FlbB. Sin embargo, se aprecia un importante incremento en la producción de cleistotecios en condiciones de luz cuando *flbB* está ausente de la célula. Estos datos sugieren que la presencia de FlbB desplaza el equilibrio de la reproducción del hongo hacia el desarrollo asexual, mientras que su ausencia provoca el efecto contrario. Se ha descrito un papel similar en el caso de mutantes *fluffy* de FlbC y FlbE (Kwon *et al.*, 2010a; Kwon *et al.*, 2010b). A pesar de la influencia de estas 3 proteínas en la cantidad de cleistotecios producidos, éstas no afectan a la naturaleza del mismo, mostrando una apariencia similar a los cuerpos fructíferos de una cepa silvestre. Sin embargo, estudios recientes describen un efecto del mutante  $\Delta flbD$  en la formación de cleistotecios, en los que éstos aparecen como cuerpos blandos y húmedos, con un número elevado de células Hülle y ascosporas “desnudas”, ya que carecen del peridio que rodea y protege a las ascosporas (Arratia-Quijada *et al.*, 2012).

## 3.- Señales inductoras de la conidiación

En esta tesis doctoral se ha abordado el estudio del efecto de diferentes señales bióticas y abióticas que modifican el proceso de diferenciación celular tras la génesis del conidióforo y su posible relación con la actividad de los UDA.

### 3.1 La luz

Existen múltiples señales que afectan a la expresión de *brlA*, y por tanto a la conidiación. El estímulo abiótico más importante en este proceso de desarrollo es la luz, cuya respuesta es mediada por el factor VeA, velvet. VeA forma parte de un complejo

proteico que agrupa tanto a los receptores de luz azul LreA y LreB, ortólogos de los “White Collar” en *Neurospora crassa*, como al receptor de luz roja, el fitocromo FphA. A pesar de que gran parte de esta tesis se ha desarrollado en cepas mutantes para *veA* que eliminan la dependencia de luz para la conidiación del hongo y la expresión de *brlA*, también se ha investigado la relación entre la luz y FlbB.

En estos experimentos se ha comprobado que el efecto de un mutante nulo de *flbB* es epistático sobre el efecto de la luz. El fenotipo de una cepa  $\Delta flbB$  *veA*<sup>+</sup> en presencia de luz es completamente aconidial, a pesar de que el alelo silvestre de *veA* induzca la conidiación en iluminación. Estos resultados colocan el estímulo de la luz por encima de FlbB en la ruta de la conidiación, sin que en ningún caso la luz se imponga a la ausencia de FlbB. Ensayos adicionales sobre una posible interacción entre las proteínas VeA y FlbB han mostrado un resultado negativo, por lo que se descarta que FlbB pueda formar parte del complejo de velvet.

A diferencia de lo que ocurre en *flbB*, un mutante nulo de *flbD* puede ver afectado su fenotipo en un fondo silvestre para *veA* en condiciones de luz. En este caso, la luz parece sobrepasar la interrupción de la ruta provocada por la ausencia de *flbD*, activando previsiblemente a *brlA*, aunque este efecto no ha sido estudiado en detalle.

### 3.2 Las oxilipinas

Las oxilipinas de 8 carbonos son compuestos que son producidos por el propio hongo y que actúan como reguladores morfológicos. Estas moléculas participan en el crecimiento celular, la diferenciación durante la conidiación y la germinación de las conidiosporas del hongo. Algunos de estos agentes actúan como inductores de los citados procesos y otros como inhibidores, para permitir el correcto desarrollo del hongo en función de las condiciones ambientales. En esta tesis hemos profundizado en el modo de actuación del 1-octen-3-ol, el cual es el principal agente inhibidor del crecimiento y de la germinación y hemos descrito el efecto inductor de la conidiación de la 3-octanona en condiciones poco favorables para el desarrollo asexual. De este modo, hemos descubierto

que el 1-octen-3-ol impide el crecimiento isotrópico de las esporas y por tanto, su germinación, siendo éste un efecto reversible.

En cuanto a la 3-octanona, ésta es capaz de inducir la conidiación de cepas *veA+* en oscuridad, las cuales muestran un reducido nivel de conidiación en ausencia del compuesto. Los ensayos llevados a cabo para tratar de determinar a qué nivel actúa la 3-octanona muestran que es necesaria la correcta función de los componentes de la ruta UDA, ya que los mutantes nulos de los UDA no ven alterado su fenotipo tras la adición del compuesto.

#### **4.- Un nuevo modelo del circuito que regula a la ruta central de la conidiación**

##### **4.1 Actualización del modelo de la ruta UDA**

En la figura D-1 se muestra el nuevo modelo de regulación e interrelación de los componentes de la maquinaria que regula la expresión del gen *brlA*. Los resultados del trabajo realizado en esta tesis permiten ampliar este modelo. En primer lugar, se ha mostrado que existe la formación de un complejo entre FlbE y FlbB que se precisa para que el sistema sea señalizado (ver modelo celular, figura D-2). La relación entre FlbB y FlbE no es transcripcional, pero sí lo es la que existe entre FlbB y el factor c-Myb FlbD. En nuestro modelo hipotetizamos un papel principal de FlbB sobre la expresión de *flbD*, y un papel específico de FlbD sobre el incremento en la expresión de *flbB* al inicio del desarrollo asexual. Ambos factores participan de forma concertada en la expresión de *brlA*. Nuevamente no se encuentran nexos entre el factor FlbC y el resto de los factores Flb. En este modelo las actividades transcripcionales propuestas son siempre positivas, y en especial hay que resaltar la nueva función de FlbB en su propia expresión, marcada con un bucle positivo en la figura D-1. Esta nueva función la hemos denominado autorregulación de FlbB. Finalmente, indicar que se incluyen en el modelo elementos reguladores desconocidos hasta la fecha y que pueden imponerse o actuar de forma concertada con la ruta UDA. Quizás en esta ruta participe la actividad de la

oxidorreductasa GmcA, cuya transcripción está regulada por FlbB de forma negativa. Ésta puede ser realizada directa o indirectamente, por lo que no se ha incluido una línea de acción directa entre FlbB y *gmcA*.

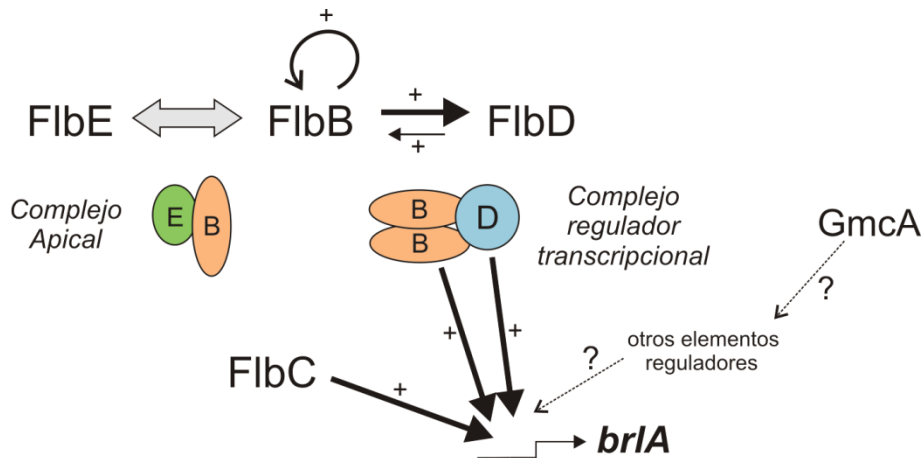


Fig. D-1: Actualización del modelo de la ruta UDA.

## 4.2 Modelo celular

El modelo celular que proponemos en la figura D-2 distingue a dos compartimentos subcelulares claramente diferenciados, la región apical y la nuclear. FlbB se localiza en ambas regiones, mientras que FlbE sólo se acumula en el ápice y FlbD sólo en los núcleos.

FlbB se acumula en la punta de la hifa y el mecanismo molecular tras esta localización requiere del transporte y la acumulación/retención en esta localización.

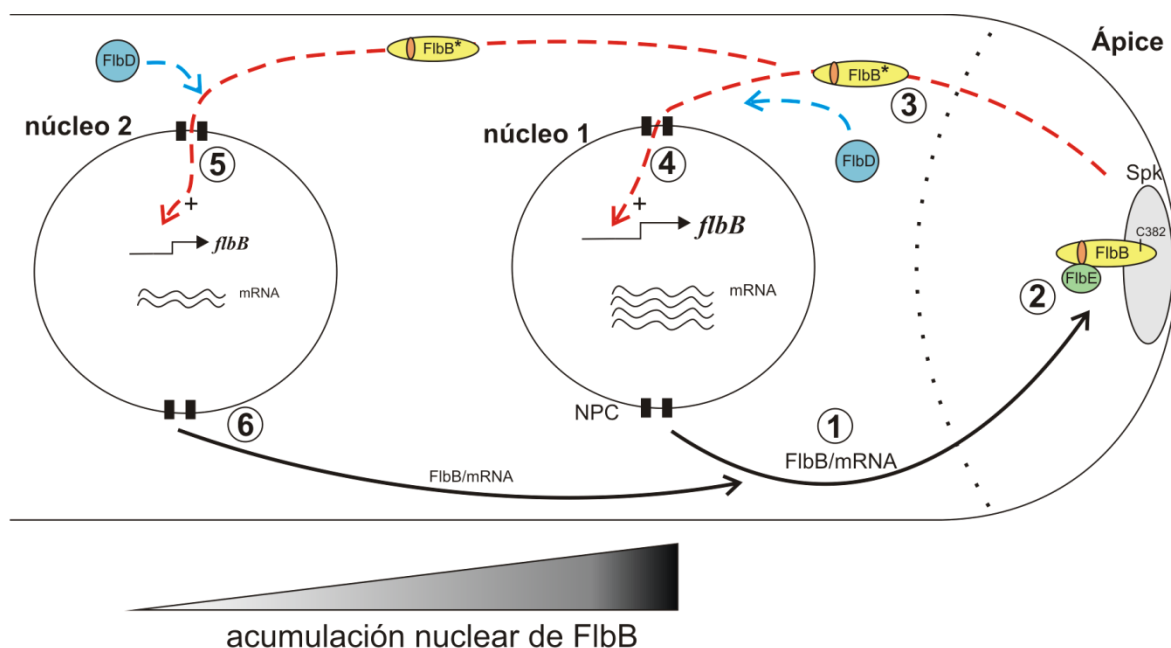
La localización de FlbB en el ápice puede deberse al transporte (1, en la figura D-2) de la proteína hasta dicha localización o también puede que el mRNA de *flbB* viaje hasta la punta para traducirse en la proximidad del *Spitzenkörper* (Spk), de manera similar a lo que ocurre con el transcrito de *ASH1* en el punto de gemación en *S. cerevisiae* (Beach *et al.*, 1999). Los intentos de visualizar la localización del transcrito de *flbB* han resultado

infructuosos, quizás debido a los bajos niveles de mRNA de este gen. En el caso de un transporte de la proteína FlbB hasta la punta, éste requerirá de motores que se mueven sobre el citoesqueleto de tubulina o de actina. Se ha demostrado que la localización de FlbB depende principalmente de los filamentos de actina (Garzia *et al.*, 2009). Por simplicidad estos mecanismos no se indican en el modelo.

El punto **2** de la figura D-2 señala la acumulación de FlbB en el ápice de la célula. Proponemos que FlbB interacciona con FlbE en esta región apical, al menos, mediante su dominio bZIP formando así el Complejo Apical. Este complejo necesita además la cisteína 382 de FlbB. La ausencia de cualquiera de estos dos elementos (FlbE o C382) deslocaliza al complejo, perdiendo su acumulación apical y por lo tanto, la señalización del efector final, el factor BrlA. FlbE se localiza en la punta de la hifa. Esta proteína no es un factor transcripcional y su función exacta es aún desconocida, pero aquí proponemos que una de sus actividades puede ser el reclutamiento de FlbB al ápice para permitir su anclaje al *Spitzenkörper* (**Spk**). La cisteína 382 también estaría involucrada en este anclaje, pero aún se desconoce el mecanismo exacto. Esta cisteína podría participar en interacciones intra- o intermoleculares. Por un lado, podría formar un puente disulfuro con alguna de las otras cisteínas de FlbB, siendo la mejor candidata la cisteína 272 debido a su elevada conservación entre los homólogos de FlbB. Por otro lado, podría interactuar con otro factor, entre los que no puede encontrarse FlbE, ya que no tiene cisteínas entre sus residuos. Otra de las posibles opciones es que la cisteína sea modificada anclándose a la membrana mediante alguno de los procesos postraduccionales que han quedado pendientes de un estudio más exhaustivo.

En esta localización apical debe tener lugar la activación de FlbB, marcada como **FlbB\*** (punto **3** de la figura D-2). Esta hipótesis se sustenta en los resultados obtenidos con cepas mutantes que expresan a FlbB de manera constitutiva y que muestran la pérdida de localización apical del mismo. Estos mutantes hipofuncionales causan un fenotipo aconidial, a pesar de la acumulación de FlbB en todos los núcleos, manifestando la importancia del paso por la punta para la activación de FlbB.

FlbB es un factor transcripcional, por lo que debe importarse al núcleo para cumplir con su función (punto **4** de la figura D-2) a través del complejo del poro nuclear (**NPC**) mediante los posibles mecanismos descritos en *A. nidulans* (Markina-Inarrairaegui *et al.*, 2011). En el núcleo también se localiza FlbD con el que FlbB interacciona para formar un complejo con función reguladora; sin embargo hipotetizamos un posible efecto de FlbD en el transporte nuclear de FlbB. FlbB ejerce su regulación positiva sobre *flbD*, *brlA* y el propio *flbB*.



**Fig. D-2: Modelo combinado de la autorregulación de FlbB y su distribución celular.**

El modelo de autorregulación de FlbB queda por lo tanto propuesto en la figura D-2 siguiendo secuencialmente los estadios **1**, **2**, **3** y **4** marcados anteriormente. Este modelo contribuye además a entender la particular localización en la célula de este factor transcripcional. Proponemos que el ciclo de autorregulación descrito anteriormente serviría para el **núcleo 1**. En el **núcleo 2** este proceso ocurriría de forma similar al del núcleo más apical, pero la cantidad de proteína FlbB activa (**FlbB\***) que lo debería

alcanzar sería sustancialmente menor **(5)** y por ello el nivel de transcrito y proteína producidas de FlbB también se vería reducido **(6)**, aunque pasaría a contribuir a la reserva citoplásmica de este factor que migraría de nuevo hacia la punta de la célula.





## **CONCLUSIONES**



- 1) El Complejo Apical está constituido al menos por FlbB y FlbE, dependiendo su formación de la interacción entre ambos factores.
- 2) El dominio bZIP de FlbB es multifuncional, al proveer de capacidad de unión a DNA, mediar en la interacción con FlbE y participar junto con regiones adyacentes, los dominios A o/y B, en la formación de homodímeros de FlbB. Todos estos elementos modulan la función y localización celular del factor transcripcional.
- 3) FlbB regula su propia expresión. Esta retroalimentación positiva imposibilita el estudio de la localización celular de mutantes de pérdida de función.
- 4) La localización de FlbB en la punta de la hifa es imprescindible para la correcta conidiación del hongo. Dicha localización de FlbB está supeditada a la presencia de FlbE en la célula, así como a la cisteína 382. La pérdida de la función de alguno de estos dos elementos reguladores causa un fenotipo aconidial que es consecuencia directa de la ausencia de activación del factor FlbB. Existe por lo tanto una forma señalizada que se necesita para la función de regulación transcripcional.
- 5) FlbD interacciona con FlbB y podría ser el responsable de reclutar a FlbB al interior nuclear.
- 6) FlbB puede tener una función dual, regulando positivamente la expresión de *flbD* y de manera negativa a la de *gmcA*. *GmcA* es una glucosa-metanol-colina oxidoreductasa cuya actividad parece estar involucrada en la conidiación a través de mecanismos aún desconocidos sobre la expresión de *brlA* en respuesta a la alcalinización del medio o la fuente de nitrógeno.
- 7) FlbB, como otros factores Flb, participa también en el equilibrio entre el ciclo sexual y asexual. La ausencia de FlbB favorece el desarrollo sexual, frente al asexual.
- 8) La oxilipina 1-octen-3-ol es un agente inhibidor de la germinación al impedir el crecimiento isotrópico de las esporas. Este es un efecto reversible que aprovecha el hongo para regular la germinación en ausencia de nutrientes o número excesivo de células fúngicas, "*crowding*".
- 9) La oxilipina 3-octanona es el principal inductor de la conidiación. Su papel activador requiere de la emergencia al aire del hongo, así como de la funcionalidad de los UDAs.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## Reference List

- Adams,T.H., Wieser,J.K., and Yu,J.H. (1998) Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 35-54.
- Aguirre,J., Hansberg,W., and Navarro,R. (2006) Fungal responses to reactive oxygen species. *Med Mycol* **44**: 101-107.
- Araújo-Bazán,L., Dhingra,S., Chu,J., Fernandez-Martinez,J., Calvo,A.M., and Espeso,E.A. (2009) Importin  $\alpha$  is an essential nuclear import carrier adaptor required for proper sexual and asexual development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **46**: 506-515.
- Araújo-Bazán,L., Peñalva,M.A., and Espeso,E.A. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **67**: 891-905.
- Arratia-Quijada,J., Sanchez,O., Scazzocchio,C., and Aguirre,J. (2012) FlbD, a Myb transcription factor of *Aspergillus nidulans*, is uniquely involved in both asexual and sexual differentiation. *Eukaryot Cell* **11**: 1132-1142.
- Asano,Y., Hagiwara,D., Yamashino,T., and Mizuno,T. (2007) Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 1800-1803.
- Atoui,A., Kastner,C., Larey,C.M., Thokala,R., Etxebeste,O., Espeso,E.A. *et al.* (2010) Cross-talk between light and glucose regulation controls toxin production and morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 962-972.
- Basu,J. (2004) Protein palmitoylation and dynamic modulation of protein function. *Current Science* **87**: 212-217.
- Bayram,O., Braus,G.H., Fischer,R., and Rodriguez-Romero,J. (2010) Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* **47**: 900-908.
- Bayram,O., Krappmann,S., Ni,M., Bok,J.W., Helmstaedt,K., Valerius,O. *et al.* (2008) VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**: 1504-1506.
- Beach,D.L., Salmon,E.D., and Bloom,K. (1999) Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Curr Biol* **9**: 569-578.
- Bieszke,J.A., Spudich,E.N., Scott,K.L., Borkovich,K.A., and Spudich,J.L. (1999) A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry* **38**: 14138-14145.



Bok,J.W., and Keller,N.P. (2004) LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell* **3**: 527-535.

Bottone,E.J., Nagarsheth,N., and Chiu,K. (1998) Evidence of self-inhibition by filamentous fungi accounts for unidirectional hyphal growth in colonies. *Can J Microbiol* **44**: 390-393.

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Butnick,N.Z., Yager,L.N., Kurtz,M.B., and Champe,S.P. (1984) Genetic analysis of mutants of *Aspergillus nidulans* blocked at an early stage of sporulation. *J Bacteriol* **160**: 541-545.

Calvo,A.M. (2008) The VeA regulatory system and its role in morphological and chemical development in fungi. *Fungal Genet Biol* **45**: 1053-1061.

Calvo,A.M., Bok,J., Brooks,W., and Keller,N.P. (2004) veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4733-4739.

Calvo,A.M., Hinze,L.L., Gardner,H.W., and Keller,N.P. (1999) Sporogenic effect of polyunsaturated fatty acids on development of *Aspergillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3668-3673.

Cary,J.W., O'Brian,G.R., Nielsen,D.M., Nierman,W., Harris-Coward,P., Yu,J. *et al.* (2007) Elucidation of veA-dependent genes associated with aflatoxin and sclerotial production in *Aspergillus flavus* by functional genomics. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 1107-1118.

Casey,P.J., and Seabra,M.C. (1996) Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* **271**: 5289-5292.

Castillo,E.A., Ayte,J., Chiva,C., Moldon,A., Carrascal,M., Abian,J. *et al.* (2002) Diethylmaleate activates the transcription factor Pap1 by covalent modification of critical cysteine residues. *Mol Microbiol* **45**: 243-254.

Chen,Y.N., Slabaugh,E., and Brandizzi,F. (2008) Membrane-tethered transcription factors in *Arabidopsis thaliana*: novel regulators in stress response and development. *Curr Opin Plant Biol* **11**: 695-701.

Chitarra,G.S., Abee,T., Rombouts,F.M., Posthumus,M.A., and Dijksterhuis,J. (2004) Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2823-2829.

Church,G.M., and Gilbert,W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1991-1995.

Cobeño,L. Identificación de la quinasa HalA y el estudio de su papel en la regulación de la homeostasis de cationes en *Aspergillus nidulans*. 2010.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Combet,E., Henderson,J., Eastwood,D.C., and Burton,K.S. (2009) Influence of sporophore development, damage, storage, and tissue specificity on the enzymic formation of volatiles in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Agric Food Chem* **57**: 3709-3717.

Cordobés,S. Estudio de la conidiación en hongos filamentosos causada por moléculas señalizadoras. 2005.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Cortese,M.S., Etxebeste,O., Garzia,A., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2011) Elucidation of functional markers from *Aspergillus nidulans* developmental regulator FlbB and their phylogenetic distribution. *PLoS One* **6**: e17505.

Cove,D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**: 51-56.

Crooks,G.E., Hon,G., Chandonia,J.M., and Brenner,S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* **14**: 1188-1190.

D'Enfert,C. (1997) Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **21**: 163-172.

Du,W., O'Brian,G.R., and Payne,G.A. (2007) Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Addit Contam* **24**: 1043-1050.

Duran,R.M., Cary,J.W., and Calvo,A.M. (2007) Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 1158-1168.

Dyer,P.S., Paoletti,M., and Archer,D.B. (2003) Genomics reveals sexual secrets of *Aspergillus*. *Microbiology* **149**: 2301-2303.

Emri,T., Molnar,Z., Szilagyi,M., and Pocsí,I. (2008) Regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* **151**: 211-220.

Etxebeste,O. Nuevos genes involucrados en la inducción de la conidiación en *Aspergillus nidulans*. 2008.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Etxebeste,O., Garzia,A., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2010) *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules. *Trends Microbiol* **18**: 569-576.

Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Araújo-Bazán,L., Rodríguez-Urra,A.B., Garzia,A., Ugalde,U., and Espeso,E.A. (2009) The bZIP-type transcription factor FlbB regulates distinct morphogenetic stages of colony formation in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **73**: 775-789.

Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Cortese,M.S., Garzia,A., Oiartzabal-Arano,E., de Los Rios,V. *et al.* (2012) GmcA Is a Putative Glucose-Methanol-Choline oxidoreductase required for the induction of asexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* **7**: e40292.

Etxebeste,O., Ni,M., Garzia,A., Kwon,N.J., Fischer,R., Yu,J.H. *et al.* (2008) Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**: 38-48.

Finkelstein,R.R., and Lynch,T.J. (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599-609.

Fontes,M.R., Teh,T., Jans,D., Brinkworth,R.I., and Kobe,B. (2003) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- $\alpha$ . *J Biol Chem* **278**: 27981-27987.

Fortwendel,J.R., Juvvadi,P.R., Rogg,L.E., Asfaw,Y.G., Burns,K.A., Randell,S.H., and Steinbach,W.J. (2012) Plasma membrane localization is required for RasA-mediated polarized morphogenesis and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **11**: 966-977.

Fujii,Y., Shimizu,T., Toda,T., Yanagida,M., and Hakoshima,T. (2000) Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Biol* **7**: 889-893.

Galagan,J.E., Calvo,S.E., Cuomo,C., Ma,L.J., Wortman,J.R., Batzoglou,S. *et al.* (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**: 1105-1115.

Garzia,A. Mecanismos moleculares de la inducción de la esporulación en *Aspergillus nidulans*. 2011. Universidad del País Vasco.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Garzia,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Fischer,R., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2009) *Aspergillus nidulans* FlbE is an upstream developmental activator of conidiation functionally associated with the putative transcription factor FlbB. *Mol Microbiol* **71**: 172-184.

Garzia,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Ugalde,U., and Espeso,E.A. (2010) The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **75**: 1314-1324.

Glass,N.L., Jacobson,D.J., and Shiu,P.K. (2000) The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annu Rev Genet* **34**: 165-186.

Glomset,J.A., Gelb,M.H., and Farnsworth,C.C. (1990) Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci* **15**: 139-142.

- Hadley,G., and Harrold,C.E. (1958) The sporulation of *Penicillium notatum*. Westling in submerged liquid culture. II.The initial sporulation phase. *J Exp Bot* **9**: 418-425.
- Harris,S.D., and Momany,M. (2004) Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genet Biol* **41**: 391-400.
- Harris,S.D., Read,N.D., Roberson,R.W., Shaw,B., Seiler,S., Plamann,M., and Momany,M. (2005) Polarisome meets spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225-229.
- Herrero-Garcia,E., Garzia,A., Cordobés,S., Espeso,E.A., and Ugalde,U. (2011) 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biol* **115**: 393-400.
- Kafer,E. (1965) Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**: 217-232.
- Kato,N., Brooks,W., and Calvo,A.M. (2003) The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2**: 1178-1186.
- Kim,H., Han,K., Kim,K., Han,D., Jahng,K., and Chae,K. (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**: 72-80.
- Kuge,S., Arita,M., Murayama,A., Maeta,K., Izawa,S., Inoue,Y., and Nomoto,A. (2001) Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol Cell Biol* **21**: 6139-6150.
- Kwon,N.J., Garzia,A., Espeso,E.A., Ugalde,U., and Yu,J.H. (2010a) FlbC is a putative nuclear C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **77**: 1203-1219.
- Kwon,N.J., Shin,K.S., and Yu,J.H. (2010b) Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **47**: 981-993.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee,B.N., and Adams,T.H. (1994a) Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**: 323-334.
- Lee,B.N., and Adams,T.H. (1994b) The *Aspergillus nidulans fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes Dev* **8**: 641-651.
- Lee,B.N., and Adams,T.H. (1996) FluG and FlbA function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA*β activation. *EMBO J* **15**: 299-309.

Lee,C.Z., Liou,G.Y., and Yuan,G.F. (2006) Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. *Microbiology* **152**: 161-170.

Lee,W., Mitchell,P., and Tjian,R. (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.

Maier,A.T., Stehling-Sun,S., Wollmann,H., Demar,M., Hong,R.L., Haubeiss,S. *et al.* (2009) Dual roles of the bZIP transcription factor PERIANTHIA in the control of floral architecture and homeotic gene expression. *Development* **136**: 1613-1620.

Markina-Inarrairaegui,A. Rutas de transporte núcleo-citoplásmicas en *Aspergillus nidulans*. 2011.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Markina-Inarrairaegui,A., Etxebeste,O., Herrero-Garcia,E., Araújo-Bazán,L., Fernandez-Martinez,J., Flores,J.A. *et al.* (2011) Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **22**: 3874-3886.

McNabb,D.S., and Pinto,I. (2005) Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1829-1839.

Meyers,D.M., O'Brian,G.R., Du,W.L., Bhatnagar,D., and Payne,G.A. (1998) Characterization of aflJ, a gene required for conversion of pathway intermediates to aflatoxin. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3713-3717.

Mims,C.W., Richardson,W.D., and Timberlake,W.E. (1988) Ultrastructural analysis of conidiophore development in the fungus *Aspergillus nidulans* using freeze-substitution. *Protoplasma* **144**: 132-141.

Mingot,J.M., Espeso,E.A., Diez,E., and Penalva,M.A. (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol Cell Biol* **21**: 1688-1699.

Mingot,J.M., Tilburn,J., Diez,E., Bignell,E., Orejas,M., Widdick,D.A. *et al.* (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol Cell Biol* **19**: 1390-1400.

Mooney,J.L., and Yager,L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**: 1473-1482.

Nayak,T., Szewczyk,E., Oakley,C.E., Osmani,A., Ukil,L., Murray,S.L. *et al.* (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557-1566.

Nemcovic,M., Jakubikova,L., Viden,I., and Farkas,V. (2008) Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiol Lett* **284**: 231-236.

- Nierman,W.C., May,G.S., Kim,H.S., Anderson,M.J., Chen,D., and Denning,D.W. (2005) What the *Aspergillus* genomes have told us. *Med Mycol* **43 Suppl 1**: S3-S5.
- Oshero,N., and May,G.S. (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol Lett* **199**: 153-160.
- Pantazopoulou,A., and Peñalva,M.A. (2009) Organization and dynamics of the *Aspergillus nidulans* Golgi during apical extension and mitosis. *Mol Biol Cell* **20**: 4335-4347.
- Peñalva,M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963-975.
- Petosa,C., Morand,P., Baudin,F., Moulin,M., Artero,J.B., and Muller,C.W. (2006) Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell* **21**: 565-572.
- Pontecorvo,G., Roper,J.A., Hemmons,L.M., MacDonald,K.D., and Bufton,A.W. (1953) The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* **5**: 141-238.
- Purschwitz,J., Muller,S., and Fischer,R. (2009) Mapping the interaction sites of *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA with the global regulator VeA and the White Collar protein LreB. *Mol Genet Genomics* **281**: 35-42.
- Purschwitz,J., Muller,S., Kastner,C., Schoser,M., Haas,H., Espeso,E.A. *et al.* (2008) Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* **18**: 255-259.
- Resh,M.D. (2006) Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE* **2006**: re14.
- Rodriguez-Galan,O., Galindo,A., Hervas-Aguilar,A., Arst,H.N., and Peñalva,M.A. (2009) Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J Biol Chem* **284**: 4404-4412.
- Rodriguez-Romero,J., Hedtke,M., Kastner,C., Muller,S., and Fischer,R. (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* **64**: 585-610.
- Rodriguez-Urra,A.B., Jimenez,C., Dueñas,M., and Ugalde,U. (2009) Bicarbonate gradients modulate growth and colony morphology in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **300**: 216-221.
- Rodriguez-Urra,A.B., Jimenez,C., Nieto,M.I., Rodriguez,J., Hayashi,H., and Ugalde,U. (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* **7**: 599-606.
- Roskoski,R., Jr. (2003) Protein prenylation: a pivotal post-translational process. *Biochem Biophys Res Commun* **303**: 1-7.

Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seo,J.A., Guan,Y., and Yu,J.H. (2006) FluG-dependent asexual development in *Aspergillus nidulans* occurs via derepression. *Genetics* **172**: 1535-1544.

Skromne,I., Sanchez,O., and Aguirre,J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141** ( Pt 1): 21-28.

Steinberg,G. (2007) Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell* **6**: 351-360.

Stinnett,S.M., Espeso,E.A., Cobeño,L., Araújo-Bazán,L., and Calvo,A.M. (2007) *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin  $\alpha$  carrier and on light. *Mol Microbiol* **63**: 242-255.

Taheri-Talesh,N., Horio,T., Araújo-Bazán,L., Dou,X., Espeso,E.A., Penalva,M.A. *et al.* (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**: 1439-1449.

Tahirov,T.H., Sato,K., Ichikawa-Iwata,E., Sasaki,M., Inoue-Bungo,T., Shiina,M. *et al.* (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBP beta cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* **108**: 57-70.

Tanaka,A., Kato,M., Nagase,T., Kobayashi,T., and Tsukagoshi,N. (2002) Isolation of genes encoding novel transcription factors which interact with the Hap complex from *Aspergillus* species. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 176-182.

Thom,C., and Raper,K.B. (1945) A manual of the *Aspergilli* Bailliére Tindall y Cox (eds). London.

Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F., and Higgins,D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**: 4876-4882.

Thompson,J.D., Higgins,D.G., and Gibson,T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.

Tilburn,J., Sarkar,S., Widdick,D.A., Espeso,E.A., Orejas,M., Mungroo,J. *et al.* (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* **14**: 779-790.

Tilburn,J., Scazzocchio,C., Taylor,G.G., Zabicky-Zissman,J.H., Lockington,R.A., and Davies,R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205-221.

- Toda,T., Shimanuki,M., Saka,Y., Yamano,H., Adachi,Y., Shirakawa,M. *et al.* (1992) Fission yeast *pap1*-dependent transcription is negatively regulated by an essential nuclear protein, Crm1. *Mol Cell Biol* **12**: 5474-5484.
- Todd,R.B., Davis,M.A., and Hynes,M.J. (2007a) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc* **2**: 822-830.
- Todd,R.B., Davis,M.A., and Hynes,M.J. (2007b) Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protoc* **2**: 811-821.
- Trinci,A.F.J., and Whittaker,C. (1968) Self-inhibition of spore germination in *Aspergillus nidulans*. *Trans Brit Mycol Soc* **51**: 594-596.
- Tsitsigiannis,D.I., and Keller,N.P. (2007) Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol* **15**: 109-118.
- Tsukada,J., Yoshida,Y., Kominato,Y., and Auron,P.E. (2011) The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* **54**: 6-19.
- Ugalde,U. (2006) Autoregulatory signals in mycelial fungi. In *The Mycota I: Growth, differentiation and sexuality*. Kües,U., and Fischer,R. (eds). Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 203-211.
- Webb,Y., Hermida-Matsumoto,L., and Resh,M.D. (2000) Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **275**: 261-270.
- Yager,L.N., Lee,H.O., Nagle,D.L., and Zimmerman,J.E. (1998) Analysis of fluG mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**: 1777-1786.
- Yang,L., Ukil,L., Osmani,A., Nahm,F., Davies,J., De Souza,C.P. *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359-1362.
- Yin,W.B., Reinke,A.W., Szilagyi,M., Emri,T., Chiang,Y.M., Keating,A.E. *et al.* (2012) bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*.
- Yu,J.H. (2006) Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *J Microbiol* **44**: 145-154.
- Zamocky,M., Hallberg,M., Ludwig,R., Divne,C., and Haltrich,D. (2004) Ancestral gene fusion in cellobiose dehydrogenases reflects a specific evolution of GMC oxidoreductases in fungi. *Gene* **338**: 1-14.



Zenz,R., Eferl,R., Scheinecker,C., Redlich,K., Smolen,J., Schonthaler,H.B. *et al.* (2008) Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther* **10**: 201.